

# Doctorat de l'Université de Toulouse

Préparé à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

---

Identification et caractérisation de nouveaux lipides bioactifs

---

Thèse présentée et soutenue, le 11 octobre 2024 par

**Silia AYADI**

**École doctorale**

BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies

**Spécialité**

Cancérologie

**Unité de recherche**

CRCT - Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse

**Thèse dirigée par**

Marc POIROT et Sandrine SILVENTE-POIROT

**Composition du jury**

M. Jean-Marc LOBACCARO, Rapporteur, Professeur, Université Clermont Auvergne

Mme Isabelle DELTON, Rapporteur, Professeure, Université de Lyon

M. Laurent MAVEYRAUD, Examineur, Professeur, Université de Toulouse III - Paul Sabatier

M. Marc POIROT, Directeur de thèse, Directeur de Recherche INSERM, Toulouse

Mme Sandrine SILVENTE-POIROT, Co-directrice de thèse, membre invité, Directrice de Recherche CNRS, Toulouse



*"Science and everyday life  
cannot and should not be  
separated."*

*Dr. Rosalind Franklin*



## REMERCIEMENTS

Il est clair que ces quelques mots ne suffiront pas à exprimer toute ma gratitude envers celles et ceux qui m'ont soutenu et accompagné tout au long de mon parcours. Ce travail n'aurait jamais pu voir le jour sans leur soutien indéfectible, et c'est avec un profond respect que je tiens à les remercier.

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury, la Professeure Isabelle Delton et le Professeur Jean-Marc Lobaccaro pour avoir accepté d'évaluer mon manuscrit. Leurs retours ont été à la fois précieux et bienveillants, et leur expertise a grandement enrichi les discussions lors de la soutenance. Grâce à eux, cette étape essentielle a été l'occasion d'échanges fructueux, dans une atmosphère à la fois stimulante et agréable.


Je tiens également à remercier également le Professeur Laurent Maveyraud, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. Sa présence et ses remarques, tant lors de la soutenance que tout au long de ces années de thèse, en tant que collaborateur, ont été très précieux. Nos échanges et réunions ont grandement contribué à faire avancer le projet et ma réflexion. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour sa disponibilité et l'attention qu'il a portée à mon travail.

Puis, tout naturellement, mes remerciements vont à mon directeur de thèse, le docteur Marc Poirot. Marc, je vous suis profondément reconnaissante de m'avoir accueillie dans votre équipe et de m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse. Vous m'avez accordé votre confiance, tout en me laissant une grande autonomie dans mon travail. Je vous remercie également pour votre disponibilité et votre soutien constant à chaque fois que j'en ai eu besoin. Vous m'avez non seulement transmis de nombreuses connaissances scientifiques, mais surtout, vous m'avez appris à tirer le meilleur de chaque expérience, qu'elle soit concluante ou non. Vous m'avez également fait découvrir et transmis votre passion pour le monde des oxystérols. Grâce à vous, j'ai trouvé ma voie et je serai toujours fière de dire que j'ai été votre étudiante, l'étudiante du lauréat du prestigieux prix Schroepfer 2023.

Aux côtés de chaque grand homme se trouve une grande dame. J'exprime ma profonde gratitude à la Docteure Sandrine Silvente-Poirot. Sandrine, je vous suis très reconnaissante pour vos conseils précieux et constructifs tout au long de ces années. Vous avez toujours été présente, avec votre porte grande ouverte, prête à échanger sur n'importe quel sujet, qu'il soit scientifique ou plus informel. J'ai toujours admiré votre rigueur scientifique, et j'ai cherché à en apprendre autant que possible sur la biologie lors des nombreuses discussions. Vous avez également su apporter une touche de gaieté dans nos couloirs, avec votre sourire et votre bonne humeur. Jusqu'à la veille de ma soutenance, vos encouragements ont réchauffé mon cœur. Je vous remercie profondément pour toute votre bienveillance et d'avoir cru en chacun de nous.

Aux côtés de nos chefs d'exception, il y a Michel Record, notre émérite en titre. Michel je tiens à vous remercier pour vos nombreux conseils et remarques à chaque présentation d'équipe. Votre expertise et votre vision ont toujours été enrichissantes pour moi, et j'admire profondément votre carrière. Vous voir et échanger avec vous a toujours été un véritable plaisir.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Philippe De Medina, notre nouveau chercheur, ainsi qu'à notre grand Régis Soules, qui m'ont prise sous leur aile dès mon arrivée. Votre encadrement a dépassé la simple transmission de connaissances, vous m'avez accompagnée dans l'acquisition de compétences, la réflexion critique et le développement de mon autonomie. Les discussions passionnantes, les rires que nous avons partagés, vos critiques constructives et vos suggestions ont grandement contribué à faire progresser mes travaux et à surmonter les impasses. J'ai également eu l'honneur de travailler et de publier avec vous, une expérience marquée par un véritable esprit d'équipe que j'ai énormément



apprécié. Philippe, j'espère sincèrement que nous aurons l'occasion de poursuivre ce duo de choc à l'avenir, car oui, j'ai été « Philippisée », et je compte bien le rester !

Maintenant, parlons de la « INOV team des coulisses » : Laly, Romane, Chloé, Khadi et Julio. Ensemble, nous avons réussi à créer notre petit noyau, et grâce à vous, la bonne humeur est devenue synonyme de tous les jours. Je suis déjà nostalgique de tous les bons moments que nous avons passés ensemble.

Khadijetou Diallo, merci pour ton soutien infaillible tout au long de nos années de thèse, surtout pendant la rédaction et la préparation de l'oral. Julio Bunay, ton énergie débordante et ta capacité à tout gérer avec le sourire m'ont inspirée plus que tu ne peux l'imaginer. Romane Ducloux/Roro, ma coloc de bureau préférée, merci pour ta gentillesse, ton soutien et tous ces moments mémorables que nous avons partagés. Chloé Gressein, "Mother of the DDC", ton sourire et ta bonne humeur ont illuminé mes journées. Je suis si heureuse que tu aies repris ce projet, il ne pouvait pas être entre de meilleures mains ! Les filles, je crois en vous et en vos thèses, et je serai là pour trinquer à votre réussite ! Laly Pucheu, "Queen of Western Blot", ma confidente et véritable pilier tout au long de ces années, je tiens à te remercier pour ton amitié si précieuse et les moments inoubliables que nous avons partagés, que ce soit dans les couloirs du CRCT ou ailleurs. Ces mots sont là pour te rappeler que tu n'étais pas simplement une collègue, mais une personne essentielle dans mon quotidien. Tu as su me redonner un sens profond à l'amitié, et ta présence dans ma vie compte autant pour moi que la belle personne que tu es. Enfin, Joffrey Michel/le J, Philippe Faivre/ Phiphiiiiiiiiiii et Myriam Belouassa/Mimi, je suis si reconnaissante d'avoir croisé votre chemin avant de partir. Vous m'avez offert votre soutien, votre bienveillance et, surtout, de véritables amitiés. J'espère pouvoir être là pour vous comme vous l'avez été pour moi.

Un immense MERCI à vous, ma Dream Team ! Grâce à vous, mes années de thèse ont été un parfait mélange de défis, de découvertes et de moments inoubliables, le tout enrichi par une expérience humaine incroyable à vos côtés.

Pour conclure, j'aimerais évidemment remercier ma famille. Maman, tu as toujours tout sacrifié pour nous, et aujourd'hui, je suis fière de te rendre fière et de pouvoir enfin te chouchouter à notre tour. Ma sœur jumelle, je n'aurais jamais pu supporter de vivre sans toi près de moi. Nous avons toujours tout fait ensemble, même quand ça ne faisait pas de sens, et ta présence est indispensable pour avancer. Félicitations pour la naissance de Joseph, qui renforce encore notre lien et remplit nos cœurs de joie. Mon frère, malgré la distance, tu as toujours été présent et m'as soutenue à chaque étape de mon parcours. La naissance d'Aksel et Ayden a ajouté encore plus de bonheur, et m'a fait découvrir le merveilleux rôle de tata (p.s. j'accepte toutes les demandes de câlins !). Mon mari, merci pour ta patience infinie, d'avoir cru en moi, et d'avoir survécu à mes monologues sur mes manips à longueur de journée (je sais que c'est fascinant). Grâce à toi, tout avait un meilleur goût, surtout quand tu cuisines ! Je remercie également mes beaux-parents, les Marseillais, pour leur soutien tout au long de mon parcours. Vous avez été une grande force pour moi, et je suis reconnaissante pour tous les bons plats et gâteaux qui ont réconforté mon cœur.


Je tiens à rendre hommage à mon père, qui nous a quitté bien trop tôt à cause de cette terrible maladie, le cancer. Papa, c'est en pensant à toi que j'ai trouvé la force et la motivation d'entreprendre ces recherches, avec l'espoir qu'un jour, d'autres pourront échapper à ce combat que tu as mené avec tant de courage.

À vous tous, je vous aime ♥

## Sommaire

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	16
1. Le cholestérol : un peu d'histoire.....	17
1.1. Structure du cholestérol.....	18
1.2. Source du cholestérol.....	19
I. Apport exogène du cholestérol.....	19
II. Biosynthèse endogène du cholestérol .....	20
1.3. Dans quel compartiment cellulaire se produit la biosynthèse du cholestérol ? .....	25
1.4. Fonctions majeures du cholestérol .....	26
1.6. Absorption du cholestérol par les cellules .....	29
1.7. Élimination de l'excès de cholestérol .....	30
1.8. Pathologies liées au cholestérol.....	31
2. Métabolites primaires du cholestérol.....	37
2.1 Les Oxystérols.....	37
2.2. Formation des oxystérols .....	38
2.2.1. Formation des oxystérols par voie non-enzymatique.....	39
I. Formation par voie non-enzymatique des hydroperoxydes et dérivés .....	39
II. Formation par voie non-enzymatique des 5,6-époxycholestanols (5,6-ECs).....	47
III. Formation par voie non-enzymatique des hydroperoxydes de cholestérol sur la chaîne latérale	54
2.2.2. Formation des oxystérols par voie enzymatique .....	57
2.2.2.1. Hydroxylation enzymatique sur la chaîne latérale.....	61
2.2.2.2. Rôle du 25-HC dans le métabolisme du cholestérol .....	70
2.2.2.3. Rôle du 25-HC dans l'immunité.....	71
2.2.2.4. Rôle du 27-HC dans le métabolisme du cholestérol .....	72
2.2.2.5. Relation entre le 27-HC et le cancer du sein .....	73
I. Cancer du sein .....	73
II. Critères moléculaires.....	74
1) Récepteurs hormonaux.....	74
a) Récepteurs des œstrogènes (ER) .....	74
b) Récepteurs de la progestérone (PR).....	77
c) L'oncogène HER2.....	77
d) Ki-67.....	78
III. Classification mondiale du cancer du sein .....	78
IV. Implication du 27-HC dans le cancer du sein ER $\alpha$ + .....	80
2.2.3. Oxydation enzymatique au niveau du cycle stéroïdien .....	83

I. Hydroxylation enzymatique au niveau du cycle stéroïdien .....	83
II. Epoxidation enzymatique du cholestérol au niveau des C5-C6 .....	85
2.3. Les acides biliaires (AB) .....	86
3. Récepteurs hépatiques nucléaires LXR aux oxystérols .....	90
3.1. Structure et fonctions des LXRs.....	90
3.2. Ligands endogènes des LXRs .....	91
3.3. Ligands exogènes des LXRs.....	94
3.4. Rôles biologiques des LXRs dans le transport et le métabolisme du cholestérol .....	98
a) Les LXRs dans l'excrétion hépatique du cholestérol .....	98
b) Les LXRs dans le Transport Inverse du Cholestérol (TIC).....	99
c) Les LXRs dans la biosynthèse du cholestérol.....	100
4. Métabolites secondaires du cholestérol .....	103
4.1. Les oxystérols poly-oxygénés .....	103
4.2. Les oxystérols sulfatés.....	109
5. Métabolisme des 5,6-ECs .....	112
5.1. La Cholestérol Époxyde Hydrolase : ChEH.....	114
5.1.1. ChEH et AEBS : THE PERFECT MATCH.....	115
5.2. Cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT).....	119
5.3. 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol (OCDO).....	121
5.4. Dendrogénine A (DDA) .....	124
6. Les 5,6-époxycholestanols (5,6-EC) : LE PHÉNIX .....	131
6.1. Réactivité des 5,6-ECs.....	132
7. Implication de la Glutathion S-transférase dans le métabolisme des stéroïdes.....	141
8. Hypothèses de travail.....	150
8.1. Hypothèse 1 : Synthèse et évaluation des propriétés biologiques d'un analogue non-hydrolysable du CDS.....	151
8.2. Hypothèse 2 : Métabolisme de l'OCDO et de ses précurseurs par le CYP27A1.....	151
8.3. Hypothèse 3 : Catalyse de la conjugaison entre le 5,6 $\alpha$ -EC et l'histamine par la hGSTA1..	151
RESULTATS.....	153
Article 1	
Introduction.....	154
Démarche .....	156
Résultats et discussions.....	170
Conclusion et perspectives.....	171
Article 2	
Introduction.....	173



Démarche .....	174
Résultats et discussions.....	199
Conclusion et perspectives.....	200
Article 3	
Introduction.....	202
Démarche .....	203
Résultat et discussion.....	234
Conclusion et perspectives.....	235
Conclusion et perspectives générales .....	238
Références.....	241
ANNEXE	277



## LISTE DES ABREVIATIONS

### Liste des Abréviations générales

**AB** Acides biliaires

**ABC** ATP-binding cassettes

**Acétyl-CoA** Acétyl-Coenzyme A

**ARNm** ARN messenger

**BHE** barrière hémato-encéphalique

**CDPX2** Chondrodysplasie ponctuée dominante liée à l'X

**CNS** système nerveux central

**CS** cancer du sein

**EBI2** Récepteur induit par le virus Epstein-Barr 2

**ER** récepteurs des œstrogènes

**FPP** Farnésyl-pyrophosphate

**GR $\alpha$**  récepteur des glucocorticoïdes  $\alpha$

**HDL** Lipoprotéines de haute densité

**HER2** récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain

**HMG-CoA** Hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA

**HR** récepteurs hormonaux

**INSIG** Insulin-induced gene

**LCAT** lecithin: cholesterol acyltransferase

**LDB** Ligand binding domain

**LDL** Light Density Lipoproteins

**LDLR** LDL Receptor

**LMSD** [LIPID MAPS](#) Structure Database

**LPS** Lipopolysaccharide

**LXR** Liver X Receptor

**mM** millimolaire


**nM** nanomolaire

**$\mu$ M** micromolaire

**NPC** Niemann-Pick

**NPC1** Niemann-Pick type C1





**NPC1L1** Niemann-Pick disease C1-like 1  
**NPC2** Niemann-Pick type C2  
**NR** récepteurs nucléaires  
**nTPM** nombre de transcrits par million  
**PR** récepteurs à la progestérone  
**PUFAs** Acides gras polyinsaturés  
**RNS** Espèces réactives de l'azote  
**ROS** Espèces réactive à l'oxygène  
**RXR** Retinoid X Receptor  
**SCAP** SREBP Cleavage-Activating Protein  
**SERM** modulateur sélectif des récepteurs des œstrogènes  
**SLiMs** modulateurs sélectifs de LXR  
**SLO** Smith–Lemli–Opitz  
**SN<sub>1</sub>** substitution nucléophile de type 1  
**SN<sub>2</sub>** substitution nucléophile de type 2  
**SRE** Sterol responsive element  
**SREBP** Sterol Regulatory Element-Binding Proteins  
**Tam** Tamoxifène  
**TIC** Voie de transport inverse du cholestérol  
**XCT** xanthomatose cérébro-tendineuse

### Liste des abréviations des enzymes

**11β-HSD1** 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1  
**11β-HSD2** 11β-hydroxystéroïde-déshydrogénase de type II  
**ACAT** Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase  
**ACAT** acyl-CoA:cholesterol acyltransferase  
**AEBS** site de liaison microsomal des anti-oestrogènes  
**CH25H** Cholestérol 25-hydroxylase  
**ChEH** Cholestérol-5,6-époxyde hydrolase  
**CYP27A1** cholestérol 27-hydroxylase  
**CYP3A4** cytochrome P450 3A4  
**CYP450** cytochrome P450



**CYP450scc** cytochrome P450 side chain cleaving

**CYP46A1** cholestérol 24S-hydroxylase

**CYP7A1** Cholestérol 7- $\alpha$ -hydroxylase

**CYP7A1** cholestérol 7- $\alpha$ -hydroxylase

**CYP7B1** 25 hydroxycholesterol 7- $\alpha$ -hydroxylase

**DHCR24** 24-déshydrocholestérol réductase

**DHCR7** 7-déshydrocholestérol réductase

**EBP** Protéine de liaison à l'emopamil

**EHS** époxydes hydrolases

**FAD** flavine adénine dinucléotide

**H6PD** hexose-6-phosphate déshydrogénase

**hGSTA1** glutathione S-transférase A1 humaine

**HMGCR** HMG-CoA réductase

**HMGCS** HMG-CoA synthase

**HSD3B7** 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 7

**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**rGSTA1** glutathion S-transférase A1 de rat

**S1P** Site-1 Protease

**S2P** Site-2 protease

**SC5D** lathosterol 5-desaturase

**STS** stéroïde sulfatase

**SULT2** sulfotransferases

Nom Commun	Nom systématique	Abréviation	Formule	ID Lipid Map
Cholestérol	cholest-5-en-3 $\beta$ -ol	CH	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	LMST01010001
cholestérol 7 $\beta$ -hydroperoxyde	7 $\beta$ -peroxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol	Chol 7 $\beta$ -OOH	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	LMST01010459
cholestérol 7 $\alpha$ -hydroperoxyde	7 $\alpha$ -peroxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol	Chol 7 $\alpha$ -OOH	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	LMST01010460
cholestérol 6 $\beta$ -hydroperoxyde	6 $\beta$ -peroxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol	Chol 6 $\beta$ -OOH	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	-
cholestérol 6 $\alpha$ -hydroperoxyde	6 $\alpha$ -peroxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol	Chol 6 $\alpha$ -OOH	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	-
cholestérol 5 $\alpha$ -hydroperoxyde	5 $\alpha$ -peroxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol	Chol 5 $\alpha$ -OOH	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	-
cholestérol 4 $\beta$ -hydroperoxyde	4 $\beta$ -peroxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol	Chol 4 $\beta$ -OOH	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	-
cholestérol 4 $\alpha$ -hydroperoxyde	4 $\alpha$ -peroxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol	Chol 4 $\alpha$ -OOH	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	-
cholestérol 27-hydroperoxyde	27-peroxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol	Chol 27-OOH	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	-
cholestérol 25-hydroperoxyde	25-peroxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol	Chol 25-OOH	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	-
cholestérol 24-hydroperoxyde	24-peroxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol	Chol 24-OOH	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	-
cholestérol 20-hydroperoxyde	20-peroxycholest-5-en-3 $\beta$ -ol	Chol 20-OOH	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	-
Cholestanetriol	cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol	CT	C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	MST01010052
Cholestanetriol sulfate	cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -O-sulfate	CDS	C <sub>27</sub> H <sub>47</sub> O <sub>6</sub> S <sup>-</sup>	-
Cholestanetriol sulfonate	cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -sulfonate	CDSN	C <sub>27</sub> H <sub>47</sub> O <sub>5</sub> S <sup>-</sup>	-
Dendrogenin A	5 $\alpha$ -Hydroxy-6 $\beta$ -[2-(1H-imidazol-4-yl)-ethylamino]-cholestan-3 $\beta$ -ol	DDA	C <sub>32</sub> H <sub>55</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	LMST05050025
Dendrogenine C	3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diHydroxycholestane-6 $\beta$ -yl-S-glutathion	DCC	C <sub>37</sub> H <sub>63</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S	-
Oncostérone	6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol cholestan-6-oxo-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol	OCDO	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	LMST01010126
7 $\beta$ -Hydroxycholestérol	cholest-5-en-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol	7 $\beta$ -HC	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	LMST01010047
7 $\alpha$ -Hydroxycholestérol	cholest-5-en-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol	7 $\alpha$ -HC	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	LMST01010013
7 $\alpha$ ,25-diHydroxycholestérol	cholest-5-en-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,25-triol	7 $\alpha$ ,25-DHC	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	LMST04030166
7 $\alpha$ ,25-diHydroxycholestenone	7 $\alpha$ ,25-diHydroxycholest-4-en-3-one	7 $\alpha$ ,25-diHCO	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>	LMST04030107
7-Céto-cholestérol-3-sulfate	7-oxo-cholest-5-en-3 $\beta$ -sulfate	7-KCS	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>5</sub> S	-
7-Céto-cholestérol	7-oxo-cholest-5-en-3 $\beta$ -ol	7-KC	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	LMST01010049
7-Céto-27-Hydroxycholestérol	3 $\beta$ ,27-diHydroxy-5-cholesten-7-one	7KC-27HC	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>	-
5 $\beta$ ,6 $\beta$ -époxycholestanol	5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxy-5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -ol	5,6 $\beta$ -EC	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	LMST01010010
5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -époxycholestanol	5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxy-5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -ol	5,6 $\alpha$ -EC	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	LMST01010011
5,6 $\alpha$ -EC sulfate	5,6 $\alpha$ -époxy-cholestérol-3 $\beta$ -sulfate	5,6-ECS	C <sub>27</sub> H <sub>45</sub> O <sub>5</sub> S <sup>-</sup>	LMST05020067
4 $\beta$ -Hydroxycholestérol	cholest-5-en-3 $\beta$ ,4 $\beta$ -diol	4 $\beta$ -HC	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	LMST01010014
4 $\beta$ ,27-diHydroxycholestérol	cholest-5-en-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,27-triol	4 $\beta$ ,27-DHC	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	LMST01010603
4 $\beta$ ,25-diHydroxycholestérol	cholest-5-en-3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,25-triol	4 $\beta$ ,25-DHC	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	-
4 $\alpha$ -Hydroxycholestérol	cholest-5-en-3 $\beta$ ,4 $\alpha$ -diol	4 $\alpha$ -HC	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	LMST01010509
27-Hydroxy-OCDO	6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,27-triol	27H-OCDO	<u>C27H46O4</u>	LMST01010580
27-Hydroxycholestérol	cholest-(25R)-5-en-3 $\beta$ ,26-diol	27-HC	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	LMST01010057
27-Hydroxy-cholestanetriol	(25R)-cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,26-tetrol	27H-CT	<u>C27H48O4</u>	LMST01010582
27-Hydroxy-5,6 $\beta$ -epoxycholestérol	5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxycholestan-3 $\beta$ ,27-diol	27H-5,6 $\beta$ EC	<u>C27H46O3</u>	LMST01010586
27-Hydroxy-5,6 $\alpha$ -epoxycholestérol	5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxycholestan-3 $\beta$ ,27-diol	27H-5,6 $\alpha$ EC	<u>C27H46O3</u>	LMST01010585
25-Hydroxycholestérol-3-sulfate	Cholest-5-en-3 $\beta$ ,25-diol 3-sulfate	25-HCS	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>5</sub> S	LMST05020064

25-Hydroxycholestérol	cholest-5-en-3 $\beta$ ,25-diol	25-HC	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	LMST01010018
24(S)-Hydroxycholestérol	cholest-5-en-3 $\beta$ ,24S-diol	24S-HC	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	LMST01010019
24(S),25-diHydroxycholestérol	cholest-5-en-3 $\beta$ ,24S,25-triol	24S,25-diHC	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	LMST01010128
22(R)-Hydroxycholestérol	cholest-5-en-3 $\beta$ ,22R-diol	22R-HC	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	LMST01010086
20R,22R-diHydroxycholestérol	cholest-5-en-3 $\beta$ ,20R,22R-triol	20R,22R-diHC	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	LMST01010200
20(S)-Hydroxycholestérol	cholest-5-en-3 $\beta$ ,20S-diol	20S-HC	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	LMST01010201
Acide cholique	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triHydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oic acid	CA	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>	LMST04010001
Acide cholesténoïque	3 $\beta$ -Hydroxycholest-5-en-25R-26-oic acid	3 $\beta$ -HCA	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>3</sub>	LMST04030072
Acide cholénique	3 $\beta$ -Hydroxy-chol-5-en-24-oic Acid	AC	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub>	LMST04010201
Aacide chénodéoxycholique	3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -DiHydroxy-5 $\beta$ -cholan-24-oic Acid	CDCA	C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>	LMST04010032

## RESUME

**M**a thèse s'inscrit dans le cadre d'études réalisées à l'interface chimie-biologie, avec pour objectifs la synthèse de standards permettant l'identification de nouveaux métabolites, définir leur mode de production et la caractérisation de leurs propriétés biologiques. Mon équipe d'accueil s'intéresse à une branche émergente dans la voie métabolique du cholestérol, centrée sur les 5,6-époxycholestanols (5,6-ECs). Cette voie génère des métabolites qui jouent un rôle important dans le développement du cancer du sein. Les 5,6-ECs sont des oxystérols produits par oxydation du cholestérol et existent sous forme de diastéréoisomères : le 5,6 $\alpha$ -EC et le 5,6 $\beta$ -EC. En situation tumorale, les 5,6-ECs sont hydrolysés en cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$  triol (CT) qui est ensuite oxydé en 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol (OCDO), un métabolite promoteur de tumeur. La sulfatation est une transformation métabolique majeure qui pourrait intervenir dans cette voie, conduisant à la production d'oxystérols sulfatés, susceptibles d'être biologiquement actifs. Cependant, l'étude de ces composés est complexe en raison de leur hydrolyse rapide. La sulfatation du CT en cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -O-sulfate (CDS) s'inscrit dans ce cadre. **I)** Nous avons synthétisé et caractérisé un analogue non-hydrolysable du CDS, le cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -sulfonate (CDSN). Ceci nous a permis d'entamer l'étude de ses propriétés biologiques et nous avons montré que le CDSN 1) inhibe la production de l'OCDO dans les cellules cancéreuses mammaires, 2) inhibe la prolifération de ces cellules et 3) potentialise l'activité cytotoxique du médicament anticancéreux : le Tamoxifène. Ces résultats montrent que le CDSN est un standard pertinent pour approfondir l'étude des propriétés biologiques du CDS. Dans cette voie métabolique, **II)** nous avons exploré l'éventuelle hydroxylation en position C25/27 de la chaîne latérale de l'OCDO, ainsi que ses précurseurs (5,6-ECs et CT), et avons étudié la conséquence de cette transformation sur son effet prolifératif. Pour ce faire, nous avons synthétisé et caractérisé ces molécules pour disposer de standards. Ceci qui nous a permis : 1) de démontrer l'existence de ces composés en tant que métabolites, 2) par des approches pharmacologiques et génétiques, nous avons établi que cette hydroxylation de la chaîne latérale en position C27 est catalysée par le cytochrome P450 CYP27A1 et enfin 3) nous avons montré que cette conversion métabolique transforme les propriétés prolifératives de l'OCDO en propriétés antiprolifératives. Ces données mettent en évidence un rôle sans précédent du CYP27A1 dans le contrôle de la cancérogenèse mammaire. D'une autre part, dans les tissus sains, le 5,6 $\alpha$ -EC est conjugué par voie enzymatique à l'histamine pour générer la Dendrogénine A (DDA), un métabolite suppresseur de tumeurs. Nous avons postulé que la glutathionne-S-transférase humaine (hGSTA1) pourrait catalyser cette réaction de conjugaison. **III)** Nous avons démontré que la hGSTA1 recombinante pure est responsable de la production de la DDA. Par des approches pharmacologiques et génétiques, nous avons validé l'importance de la hGSTA1 dans son activité synthétase de la DDA. Nous avons synthétisé des analogues chimiques qui nous ont permis la cristallisation des complexes hGSTA1-substrats et hGSTA1-produits, démontrant ainsi que l'enzyme utilise comme substrat des dérivés de cholestérol et catalyse cette réaction de conjugaison avec l'histamine.

## ABSTRACT

**M**y thesis is situated at the interface of chemistry and biology, with the objectives of synthesizing standards for the identification of new metabolites, defining their production mechanisms, and characterizing their biological properties. My host team focuses on an emerging branch in the cholesterol metabolic pathway, centered on 5,6-epoxycholestanols (5,6-ECs). This pathway generates metabolites that play a crucial role in breast cancer development. The 5,6-ECs are oxysterols produced by cholesterol oxidation and exist as diastereoisomers: 5,6 $\alpha$ -EC and 5,6 $\beta$ -EC. In tumor conditions, the 5,6-ECs are hydrolyzed into cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT), which is subsequently oxidized into 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol (OCDO), a tumor-promoting metabolite. Sulfation is a major metabolic transformation that might intervene in this pathway, leading to the production of biologically active sulfated oxysterols. However, studying these compounds is challenging due to their rapid hydrolysis. The sulfation of CT into cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -O-sulfate (CDS) is relevant here. **I)** We synthesized and characterized a non-hydrolyzable analogue of CDS, cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -sulfonate (CDSN). This allowed us to begin studying its biological properties, showing that CDSN 1) inhibits OCDO production in breast cancer cells, 2) inhibits the proliferation of these cells, and 3) potentiates the cytotoxic activity of the anticancer drug Tamoxifen. These results indicate that CDSN is a relevant standard for further studies on the biological properties of CDS. In this metabolic pathway, **II)** we explored the potential C25/27 hydroxylation of the OCDO side chain, as well as its precursors (5,6-ECs and CT), and studied the effect of this transformation on its proliferative impact. To do this, we synthesized and characterized these molecules as standards. This enabled us to 1) demonstrate the existence of these compounds as metabolites, 2) establish, through pharmacological and genetic approaches, that this side-chain C27 hydroxylation is catalyzed by cytochrome P450 CYP27A1, and 3) show that this metabolic conversion transforms OCDO's proliferative properties into antiproliferative properties. These findings highlight an unprecedented role of CYP27A1 in controlling breast carcinogenesis. Additionally, in healthy tissues, 5,6 $\alpha$ -EC is enzymatically conjugated to histamine to generate Dendrogenin A (DDA), a tumor suppressor metabolite. We hypothesized that human glutathione S-transferase (hGSTA1) could catalyze this conjugation reaction. **III)** We demonstrated that pure recombinant hGSTA1 is responsible for DDA production. We validated the importance of hGSTA1 in its DDA synthase activity in whole cells through pharmacological and genetic approaches. We synthesized chemical analogues that allowed the crystallization of hGSTA1-substrate and hGSTA1-product complexes, demonstrating that the enzyme uses cholesterol derivatives as substrates and catalyzes this conjugation reaction with histamine.



## RESUME GRAND PUBLIC

**L**es métabolites sont de petites molécules produites par notre corps dans le cadre de divers processus physiologiques qui jouent un rôle clé dans notre santé. Leur exploration révèle des perspectives fascinantes pour l'amélioration de notre qualité de vie. Un exemple frappant est la relation qui existe entre le cholestérol et le cancer, un sujet sur lequel l'équipe de recherche qui m'a accueillie travaille. Ils ont découvert que certains métabolites du cholestérol nommés Oncosterone (OCDO) et Dendrogénine A (DDA), contrôlent l'apparition de cancers du sein, en jouant respectivement un rôle de promoteur ou suppresseur de tumeur. Ainsi nous avons pu mettre en évidence que l'effet promoteur de tumeur de l'OCDO est contrôlé à son tour par son métabolisme. Nous avons pu élucider le chemin qui mène à la formation de la DDA en identifiant l'enzyme qui la génère. Ce travail ouvre de nombreuses perspectives sur l'existence de nouveaux mécanismes contrôlant l'apparition des cancers du sein.

## RESUME GRAND PUBLIC

**M**etabolites are small molecules produced by our bodies as part of various physiological processes, playing a crucial role in our health. Their exploration unveils fascinating prospects for improving our quality of life. A striking example is the relationship between cholesterol and cancer, a subject investigated by the research team that hosted me. They discovered that certain cholesterol metabolites, named Oncosterone (OCDO) and Dendrogenin A (DDA), regulate the development of breast cancer, acting respectively as a tumor promoter and a tumor suppressor. Consequently, we demonstrated that the tumor-promoting effect of OCDO is, in turn, regulated by its metabolism. We elucidated the pathway leading to the formation of DDA by identifying the enzyme responsible for its production. This work opens numerous prospects for the existence of new mechanisms controlling the onset of breast cancer.



## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE



## 1. Le cholestérol : un peu d'histoire

Le cholestérol (cholest-5-èn-3 $\beta$ -ol), représente le lipide stéroïdien le plus abondant dans l'organisme. Son appellation provient du grec "chole-" (bile) et "stereos" (solide), en référence à sa découverte sous forme solide dans les calculs biliaires en 1758 par le chimiste français François Poulletier de La Salle (Bodo 2015). Néanmoins, un autre scientifique français, Michel-Eugène Chevreul a été le premier à attribuer le nom de "cholestérine" en 1816 qui ultérieurement a été reconnu comme un alcool et a été nommé cholestérol (Bodo 2015) (Figure 1). L'importance de cette découverte s'est concrétisée au 20<sup>ème</sup> siècle par l'attribution de treize Prix Nobel décernés à des scientifiques ayant étudié la structure du cholestérol, sa voie de biosynthèse et sa régulation métabolique. Le premier de ces prix a été décerné en 1928 à Windaus et Wieland pour avoir déterminé la structure du cholestérol. Le prix le plus récent a été décerné à Brown et Goldstein en 1985 pour leurs découvertes concernant la régulation du métabolisme du cholestérol. Bien que 200 ans se soient écoulés depuis, le cholestérol continu de susciter l'intérêt des chercheurs ainsi que du grand public (Bodo 2015; Haris 2016). Il ne fait aucun doute qu'il reste encore beaucoup à faire avant d'atteindre une compréhension exhaustive du rôle de cette molécule, aussi petite que fascinante, dans les processus vitaux. En effet, le cholestérol est indispensable à la vie, il contrôle non seulement la structuration des membranes et contribue au fonctionnement normal des cellules (Smondylrev et Berkowitz 1999), mais est aussi le précurseur de lipides bioactifs tels que les oxystérols (Schroepfer 2000), les hormones stéroïdes (Miller 2013), et les acides biliaires (Chiang 2009). En raison de son rôle crucial, la régulation des niveaux de cholestérol dans les cellules s'opère par le biais de plusieurs mécanismes, notamment la synthèse *de novo*, le transfert intracellulaire, stockage, ainsi que son élimination via des voies d'efflux et métaboliques. Dans cette première partie nous allons aborder ces sections.



Figure 1: Portrait de quelques chimistes ayant apporté leur contribution à l'étude et à la détermination de la structure du cholestérol. Adaptée de Bodo, Bernard. 2015. « De la substance à la structure ».

## 1.1. Structure du cholestérol

Le cholestérol est une molécule amphiphile polycyclique dérivée du squelette stérane, contenant 27 atomes de carbone, de formule brute  $C_{27}H_{46}O$ . Sa structure chimique comporte plusieurs caractéristiques essentielles qui définissent trois domaines distincts. Le domaine I représente le cœur de la molécule, composé d'un noyau tétra-cycliques de 17 atomes carbone, désignés A, B, C (trois cycles à six chaînons) et D (un cycle à cinq chaînons), formant un cyclo-pentano-perhydro-phénanthrène. Ce système d'anneaux tétra-cycliques hydrophobes adopte une configuration *trans*, conférant au cholestérol une rigidité plane renforcée par une double liaison entre les atomes de carbone C5 et C6 du cycle B, ainsi que par des groupements méthyle en position C10 et C13, à l'exception de la chaîne latérale d'isooctyle flexible portée sur le carbone C17. Cette chaîne latérale constitue le domaine II, dont l'orientation est déterminée par la configuration naturelle (R) en C20. Ainsi, la seule caractéristique hydrophile du cholestérol réside, dans son groupe  $\beta$ -hydroxyle en C3, situé au niveau du cycle A, formant le domaine III (Róg et al. 2009; Nes 2011a) (Figure 2 A,B). Le cholestérol possède huit centres chiraux (Figure 2 C), ce qui théoriquement engendre 256 diastéréoisomères possibles, bien qu'un seul soit présent dans la nature, le diastéréoisomère  $3\beta$ -ol lévogyre (Woodward et al. 1951). Il est également important de considérer la dimensionnalité de la molécule (Figure 2 C), car le cholestérol est une molécule asymétrique, sa face  $\alpha$  correspond à une surface lisse et plutôt plane, tandis que la face  $\beta$  est une surface avec des bords rugueux dus aux groupes méthyles en position C18 et C19 ainsi que le

groupement hydroxyle en position C3 (Ohvo-Rekila 2002). Cette structure fait que le cholestérol constitue une excellente plateforme pour la biosynthèse de molécules chirales bioactives notamment en série oxystérol.

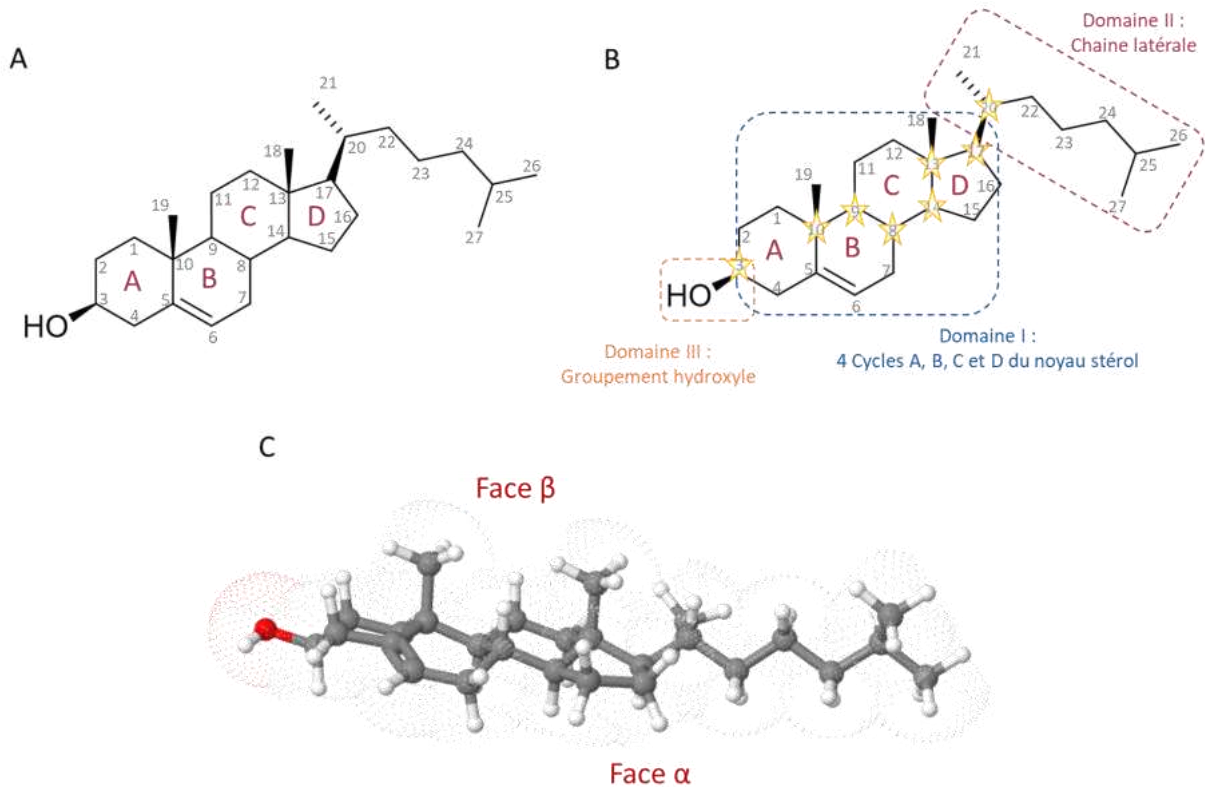


Figure 2 : A : Structure chimique du cholestérol avec la numérotation des atomes de carbone. B: Illustration des trois domaines d'importance fonctionnelle et des carbones asymétriques qui sont marqués par une étoile. C: illustration tridimensionnelle du cholestérol avec une représentation en bâtons.

## 1.2. Source du cholestérol

### I. Apport exogène du cholestérol

Le cholestérol provient principalement de deux sources. On estime qu'environ 70 % du cholestérol total est synthétisé *de novo*, tandis que 30 % est apporté par l'alimentation. La contribution relative des sources à cet apport total de cholestérol dans l'organisme dépend notamment de la quantité de cholestérol ingérée (Schoenheimer et Breusch 1933) car la biosynthèse endogène est régulée négativement par une alimentation riche en cholestérol (McNamara et al. 1987). En moyenne, la production du cholestérol endogène se situe entre 600 et 900 mg/jour, tandis que l'apport alimentaire en cholestérol est compris entre 300 et 500 mg/jour. De ces 1200 mg de cholestérol acquis, on estime que 400 à 600 mg sont dégradés

en acides biliaires, 600 mg sont éliminés dans la bile, et le reste, soit environ 150 mg, sont dédiés pour ses fonctions, dont le renouvellement des membranes cellulaires ainsi que la synthèse d'hormones stéroïdes (Figure 3) (Joyce J. Repa et Mangelsdorf 2000; Dietschy et Turley 2002). En résumé, le pool intracellulaire global de cholestérol constitue une balance entre : i) biosynthèse, ii) production et absorption par les lipoprotéines via la voie de transport inverse du cholestérol (TIC), iii) son stockage sous forme estérifiée dans des gouttelettes lipidiques intracellulaires, et iv) sa métabolisation par des processus d'oxydation (Gonen et Miller 2020).

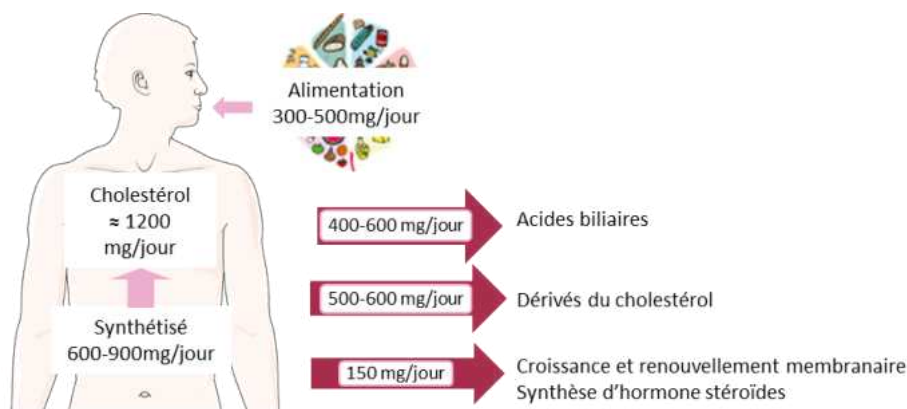


Figure 3: schéma simplifié de l'apport et la répartition globale du cholestérol chez l'humain.

### II. Biosynthèse endogène du cholestérol

En plus de l'apport exogène, les cellules extra-hépatiques synthétisent autant de cholestérol que le foie, bien que le foie soit le principal site de synthèse (Dietschy, Turley, et Spady 1993). La biosynthèse du cholestérol est régulée par les taux cellulaires de cholestérol et est répartie dans différents compartiments cellulaires, commençant dans le cytosol puis se poursuivant principalement dans le peroxysome et le réticulum endoplasmique. Le cholestérol est synthétisé via la voie de biosynthèse des isoprénoïdes et elle débute à partir de l'acétate issu du catabolisme des glucides, des protéines et des lipides, sous sa forme active : l'acétyl-Coenzyme A (l'acétyl-CoA), et implique six étapes clés (Figure 4) (Goldstein, DeBose-Boyd, et Brown 2006; Nes 2011b; Mazein et al. 2013; Cerqueira et al. 2016).

1. La première étape de la biosynthèse du cholestérol conduit au mévalonate. Elle commence par la condensation de deux molécules d'acétyl-CoA ( $C_2$ ) pour former l'acétoacétyl-CoA ( $C_4$ ), qui à son tour réagit avec une troisième molécule d'acétyl-CoA, générant le 3-Hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA (HMG-CoA), une molécule à six carbones ( $C_6$ ). Ces deux premières réactions sont catalysées par l'acétoacétyl-CoA thiolase et la HMG-CoA synthase, respectivement. Par la suite, l'HMG-CoA est converti en mévalonate par l'HMG-CoA réductase (HMGCR), enzyme qui constitue l'étape limitante et irréversible de la voie de biosynthèse du cholestérol, et est également la cible des médicaments hypolipidémiants (statines) afin d'inhiber sa synthèse.
2. Le mévalonate est ensuite converti par une série de réactions de phosphorylation, de décarboxylation et de déphosphorylation en isopentényl-pyrophosphate (IPP), l'unité isoprène de base en ( $C_5$ ) qui par une série de condensation mène à la formation du farnésyl-pyrophosphate (FPP) à 15 carbones ( $C_{15}$ ). Ce dernier représente un point de ramification vers différentes voies dont celle du cholestérol.
3. La condensation de deux substrats de FPP conduisant au squalène à 30 carbones ( $C_{30}$ ), servant de précurseur au squalène-2,3S-époxyde.

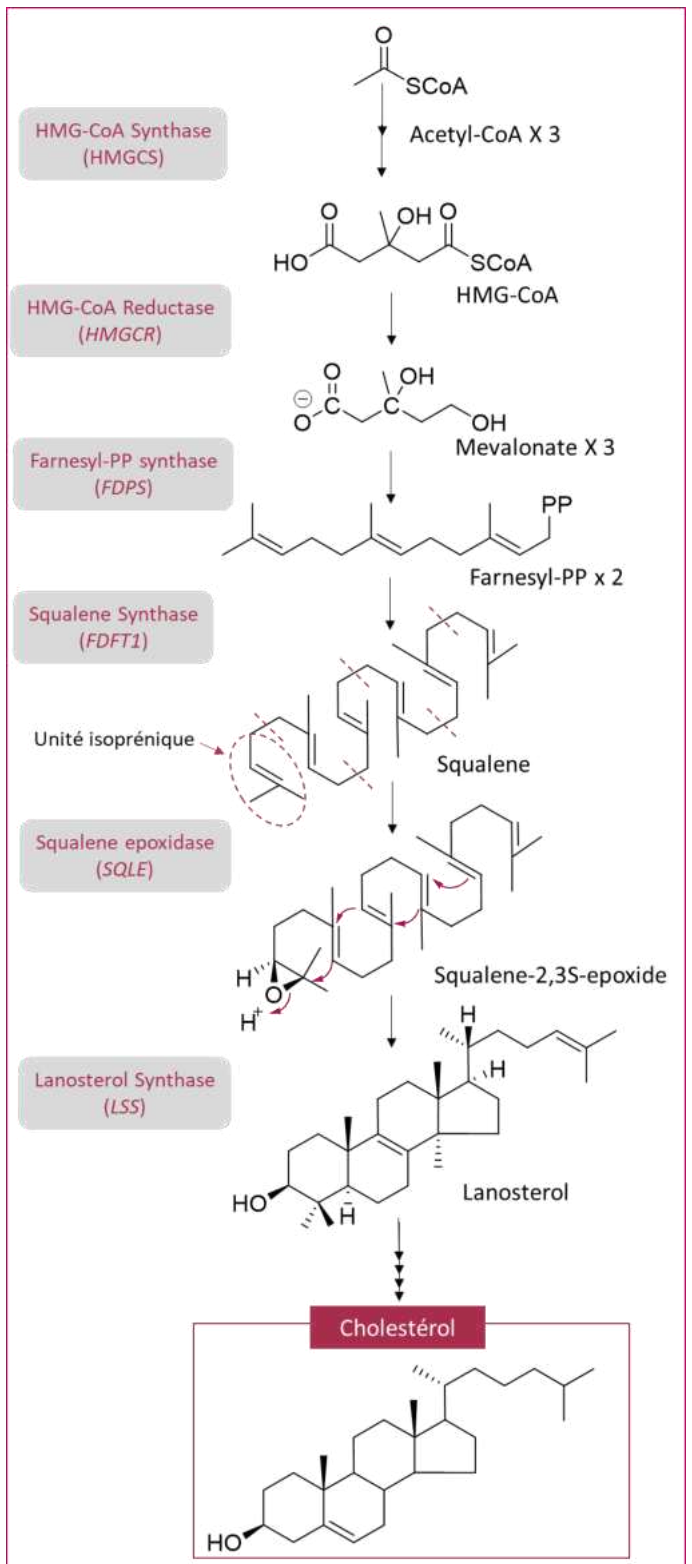


Figure 4: Schéma de la synthèse endogène du cholestérol à partir de l'acétyl-CoA

4. La formation du squalène-2,3S-époxyde implique l'introduction d'un groupement époxyde, qui ultérieurement deviendra le groupe  $\beta$ -hydroxyle du cholestérol.
5. La cyclisation du squalène-2,3S-époxyde en lanostérol (C<sub>30</sub>) par réarrangement spécifique des doubles liaisons favorisant une réaction concertée impliquant des déplacements de groupement méthyles et d'hydrures, conduisant à la transformation du squalène époxyde linéaire en une structure cyclique.
6. Formation du cholestérol à 27 carbones à partir du lanostérol par une série de réactions enzymatiques comprenant une C14-déméthylation suivie par une C14-réduction, deux C4-déméthylation, C8→C7 isomérisation, C24-réduction, C5-désaturation, et C7-réduction (Goldstein, DeBose-Boyd, et Brown 2006; Nes 2011b; Mazein et al. 2013; Cerqueira et al. 2016).

En effet, à partir du lanostérol, deux voies de biosynthèse conduisant à la biosynthèse du cholestérol ont été caractérisées (Figure 5). La voie de Bloch (Bloch 1965) et la voie de Kandutsch-Russell (Kandutsch et Russell 1960), qui font toutes deux appel aux mêmes enzymes mais diffèrent dans la première et dernière étape. Ainsi, le zymostérol dans la voie de Bloch et le zymosténol dans les voies de Kandutsch-Russell sont les précurseurs du cholestérol. La différence entre ces deux molécules repose sur la présence d'une double liaison en position C24. Dans la voie de Bloch, la dernière étape consiste en la conversion du desmostérol en cholestérol, catalysée par la 24-déshydrocholestérol réductase (DHCR24). Ainsi, tous les intermédiaires de cette voie, du lanostérol au desmostérol présentent une double liaison en C24. En revanche, dans la voie de Kandutsch-Russell, la DHCR24 agit directement sur le lanostérol lors de la première étape. Ainsi, tous les intermédiaires de cette voie, du 24,25-dihydrolanostérol au 7-déhydrocholestérol, contiennent une chaîne latérale saturée. La dernière enzyme dans cette voie est la 7-déshydrocholestérol réductase (DHCR7), responsable de la production de cholestérol à partir du 7-dehydrocholestérol, un précurseur également de la cholécalciférol (vitamine D3), par une réaction impliquant l'ouverture et l'isomérisation du cycle B sous l'action de la lumière ultraviolette (UVB:280-320nm) (Ačimovič et Rozman 2013; Prabhu et al. 2016). L'étude menée par Mitsche et ses collègues indiquent que la contribution relative des deux voies varie selon le type de cellule et le tissu (Mitsche et al. 2015). Aucun tissu chez la souris ne semble emprunter la voie de Kandutsch-Russell classique, mais plutôt, une voie hybride de Kandutsch-Russell dans laquelle le lanostérol

emprunte d'abord la voie de Bloch jusqu'au zymostérol, où la DHCR24 intervient pour réduire la chaîne latérale, permettant ainsi de continuer par la voie de Kandutsch-Russell. La voie de Bloch est responsable de plus de 90% de la biosynthèse du cholestérol dans les testicules, la rate et les glandes surrénales, tandis que la voie hybride de Kandutsch-Russell prédomine, représentant plus de 70% de la biosynthèse du cholestérol dans le cerveau, la peau et le préputium et les cellules hépatiques (Mitsche et al. 2015) . Cette hypothèse est soutenue par les travaux de Bae et Paik, qui ont montré que l'enzyme DHCR24 favorise le zymostérol comme substrat plutôt que le lanostérol (Bae et Paik 1997). En somme, la biosynthèse du cholestérol se révèle être un processus énergétiquement coûteux, au cours duquel la production d'une molécule de cholestérol nécessite 18 moles d'acétyl-CoA (source d'atome de carbone), 36 moles d'ATP et 16 moles de NADPH (source d'énergie) (F. Lu, Ferriero, et Jiang 2022) et 11 molécules d'oxygène sont nécessaires le long de la voie (Coates et al. 2023) dont 10 sont consommées dans la voie post-squalène (F. Lu, Ferriero, et Jiang 2022). Ce processus se déroule en 37 étapes (C. Murphy et al. 2020; Long, Debler, et Li 2022) et requiert 22 enzymes distinctes (Sharpe, Coates, et Brown 2020) depuis l'acétyl-CoA jusqu'à la formation du cholestérol. Une fois synthétisé, le cholestérol est intégré majoritairement sous forme estérifiée par un acide gras dans les lipoprotéines en vue de son excrétion dans la circulation sanguine et sert de précurseurs aux hormones stéroïdiennes, aux oxystérols, et aux acides biliaires.



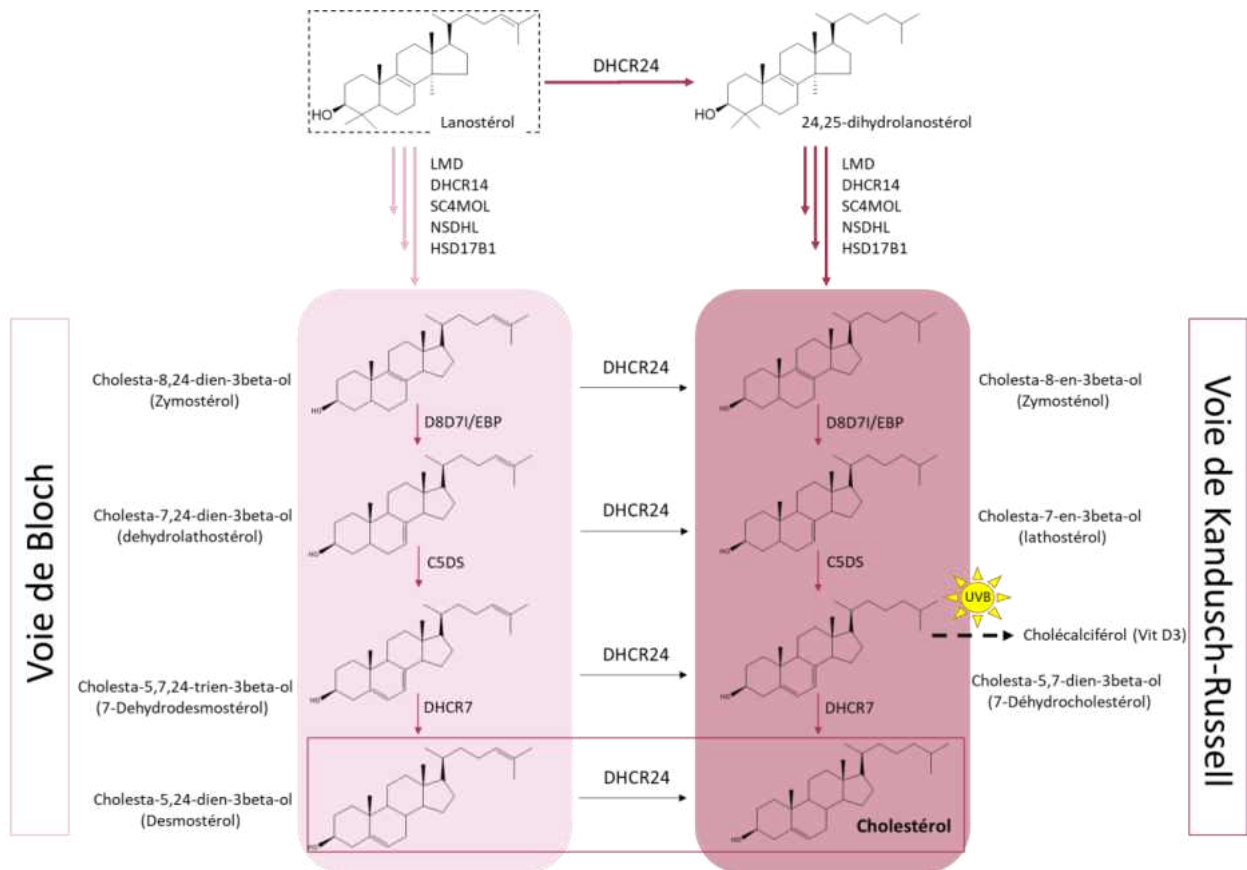


Figure 5: Schéma simplifié de la voie de biosynthèse du cholestérol à partir du lanostérol.



### 1.3. Dans quel compartiment cellulaire se produit la biosynthèse du cholestérol ?

Les étapes de la biosynthèse du cholestérol ont lieu dans divers compartiments cellulaires, le cytosol, les mitochondries, les peroxysomes et le réticulum endoplasmique. Le processus commence par la condensation de l'acétyl-CoA et de l'acétoacétyl-CoA par l'HMG-CoA synthase (HMGCS) pour former l'HMG-CoA, qui est le point de départ vers la formation du mévalonate. Cette réaction se produit simultanément dans trois compartiments cellulaires : le cytoplasme, les mitochondries, et les peroxysomes. L'HMGCS1 est une enzyme cytoplasmique, tandis que l'HMGCS2 est localisée dans les mitochondries et les peroxysomes (Kovacs et al. 2007). Ortiz et ses collègues ont montré l'implication de l'HMGCS2 mitochondriale dans la production de HMG-CoA, qui est

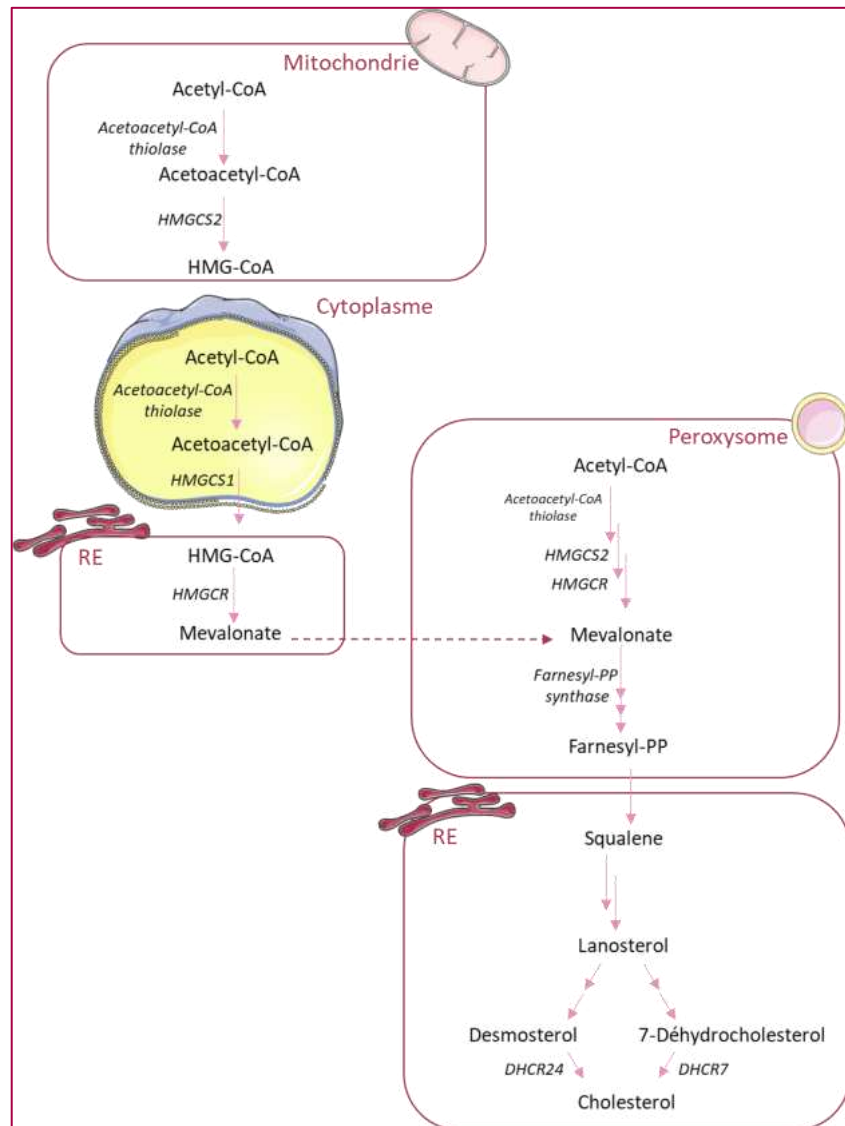


Figure 6: Localisation subcellulaire des réactions enzymatiques impliquées dans la biosynthèse du cholestérol dans les cellules.

ultérieurement converti en cholestérol (Ortiz et al. 1994). La localisation peroxysomale de cette enzyme a ensuite été validée par Olivier et ses collègues, et l'importance de la voie peroxysomale dans la production de cholestérol a été mise en évidence (Olivier et al. 2000; Olivier et Krisans. 2000). L'HMG-CoA formé est ensuite converti en mévalonate par la HMG-CoA réductase (HMGCR) localisée dans le réticulum endoplasmique et le peroxysome (Kovacs, Olivier, et Krisans 2002). Le mévalonate ainsi formé diffuse dans les peroxysomes, où il rencontre le mévalonate produit localement, et est converti en FPP. À partir du squalène, les réactions se poursuivent exclusivement dans le réticulum endoplasmique, ce qui en fait le

principal site de production du cholestérol (Figure 6). Une fois synthétisé, le cholestérol est distribué entre les différentes membranes cellulaires, y compris la membrane plasmique et les membranes des organites, soit par voie vésiculaire, soit grâce à des protéines de transport (Faust et Kovacs 2014; Arenas, Garcia-Ruiz, et Fernandez-Checa 2017).

#### 1.4. Fonctions majeures du cholestérol

Le cholestérol remplit plusieurs fonctions, allant de sa contribution à la structuration des membranes biologiques à son rôle de précurseur dans différentes voies métaboliques. En effet, il est précurseur dans la voie de la formation des hormones stéroïdiennes, telles que les androgènes, les glucocorticoïdes, les minéralo-corticoïdes, la progestérone et les œstrogènes. En effet celles-ci sont formées à partir du cholestérol via les enzymes de la stéroïdogénèse, présentes dans les tissus stéroïdogéniques primaires (gonades, et les glandes surrénales) au niveau des mitochondries (Miller 2013). L'étape limitante commune à la production de toutes ces hormones est la formation de la prégnénolone à partir du cholestérol. Cette conversion implique trois étapes successives de mono-oxygénation. Les deux premières consistent en l'hydroxylation régio- et stéréo- sélective de la chaîne latérale du cholestérol successivement aux positions C22 puis C20, formant ainsi le 20R,22R-dihydroxycholestérol (20R,22R-diHC), via l'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol, le cytochrome P450<sub>sc</sub> (side chain cleaving ; CYP450<sub>sc</sub>) (CYP11A1) (Hanukoglu 1992) (Figure 7). La troisième étape implique le clivage de la chaîne latérale entre les positions C20-C22 par cette même enzyme, conduisant à la prégnénolone ( Hanukoglu 1992, Griffiths et Wang 2020). Par ailleurs, le cholestérol est impliqué dans la production des oxystérols, molécules qui résultent de son oxygénation (voir section 2.1). On compte parmi les oxystérols des molécules de signalisation capables de réguler divers processus biologiques en se liant à des récepteurs tel que les LXR (Liver X Receptors), ou les SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins), qui exercent un contrôle essentiel sur l'homéostasie du cholestérol (Olkkonen et Hynynen 2009) . D'autres études ont mis en évidence leur implication également dans différentes pathologies (Poli et al. 2013; Sottero et al. 2019a). Le cholestérol est également précurseur pour la synthèse des acides biliaires (voir section 2.3). Au niveau hépatique, le cholestérol est converti en acides biliaires, qui jouent un rôle essentiel dans son excrétion et favorisent l'absorption des lipides et des vitamines liposolubles dans l'intestin (Kiriya et Nochi 2019). D'une autre part, le cholestérol remplit également des fonctions importantes dans les membranes cellulaires. Il

intervient dans la structuration, la dynamique et le fonctionnement des membranes biologiques. Lorsqu'il est incorporé dans les bicouches lipidiques, le cholestérol du fait de son caractère amphiphile, se place entre les lipides, orientant sa tête polaire vers la phase aqueuse et alignant son corps rigide avec les chaînes d'acides gras des phospholipides. Cette organisation induit une condensation de la membrane, avec une perméabilité réduite de celle-ci (Figure 8) (Smondyrev et Berkowitz 1999; Simons et Vaz 2004). Le cholestérol exerce une influence notamment sur la fonctionnalité de nombreuses protéines membranaires et participe à plusieurs processus de trafic et de signalisation transmembranaire. De manière non directe en modifiant la dynamique membranaire, ou en interagissant directement avec ces protéines en altérant leur structure tridimensionnelle (Simons et Ikonen 1997; Lingwood et Simons 2010).

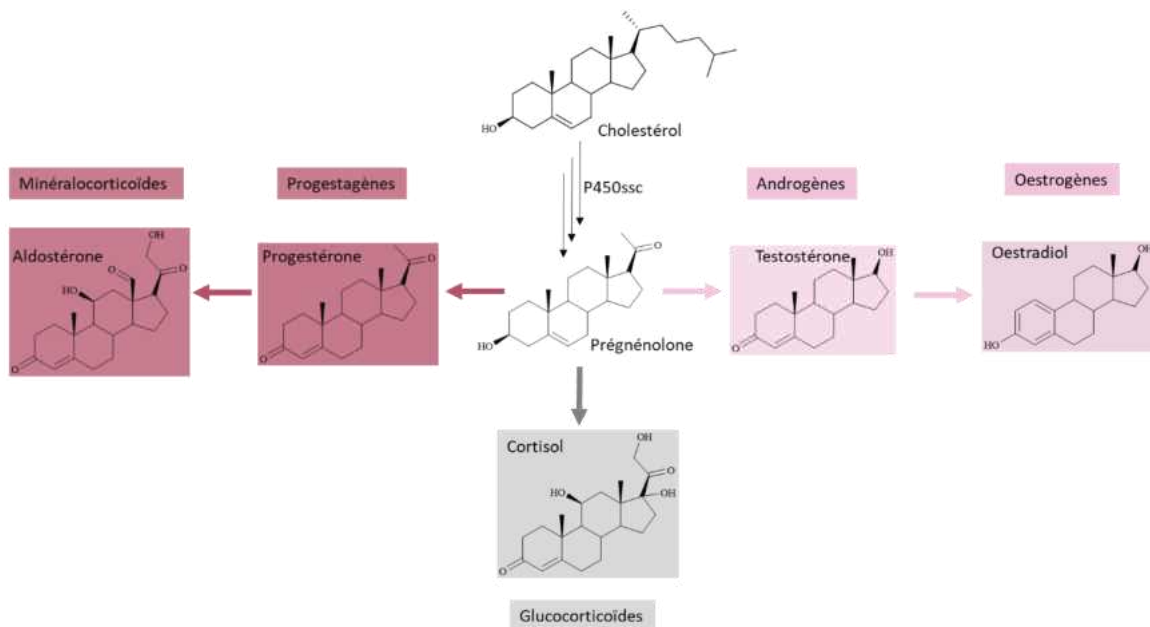


Figure 7 : Le rôle du cholestérol dans la synthèse des hormones stéroïdiennes : androgènes, œstrogènes, glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes et progestagènes.

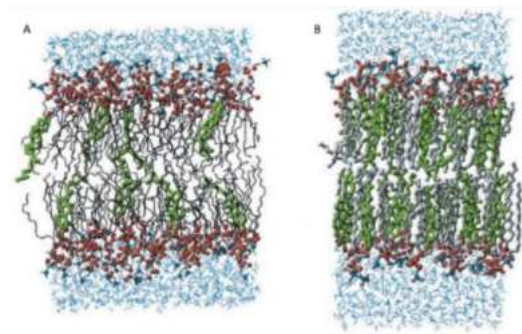


Figure 8 : Modélisation d'une bicouche lipidique comprenant soit, A: 11 mol % de cholestérol (en vert) ou B: 50 mol % de cholestérol. D'après Smondyrev and Berkowitz, 1999.

### 1.5. Régulation transcriptionnelle de la biosynthèse du cholestérol

Au centre de la régulation transcriptionnelle de la voie de biosynthèse du cholestérol se trouve la famille de protéines de liaison aux éléments de réponse aux stérols (SREBP) (Sharpe et Brown 2013), qui sont des facteurs de transcription membranaire à boucle hélice-hélice basiques à motif « leucine-zipper » (bHLH-LZ). Cette famille est composée de trois isoformes appelées SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2 (X. Cheng, Li, et Guo 2018). Les isoformes SREBP-1a et SREBP-1c activent principalement les gènes impliqués dans la synthèse des acides gras, tandis que la SREBP-2 active principalement les gènes responsables de l'absorption et la biosynthèse du cholestérol (Horton, Goldstein, et Brown 2003). La SREBP-2 réside sous forme de protéine précurseur qui est transcriptionnellement inactive dans la membrane du réticulum endoplasmique en formant un complexe avec une protéine régulatrice sensible au cholestérol appelée SCAP (SREBP Cleavage-Activating Protein). Lorsque le taux de cholestérol cellulaire est élevé (> 5% moles de cholestérol du réticulum endoplasmique) (Radhakrishnan et al. 2008), SCAP se lie à une autre protéine du réticulum endoplasmique, INSIG (Insulin-induced gene), retenant ainsi le complexe SCAP/SREBP-2 dans le réticulum endoplasmique en formant un complexe trimérique. Ceci inhibe la transcription du gène codant pour le récepteur des LDL (LDLR) ainsi que divers gènes nécessaires à la biosynthèse du cholestérol, entraînant ainsi une réduction de l'absorption et de la production du cholestérol (Horton, Goldstein, et Brown 2002). Lorsque le taux de cholestérol cellulaire est bas, SCAP change de conformation, se libère de la protéine INSIG et entraîne le précurseur SREBP-2 vers le Golgi par l'intermédiaire de vésicules dites COPII (Coat Protein complex II) (Lord, Ferro-Novick, et Miller 2013). Une fois dans le Golgi, l'activation de SREBP-2 implique une cascade protéolytique en deux étapes successives faisant intervenir les protéases S1P (Site-1 Protease) et S2P (Site-2 protease) libérant ainsi le facteur de transcription actif (Goldstein, DeBose-Boyd, et Brown 2006). La forme maturée de SREBP-2 est alors transportée dans le noyau pour interagir avec le « sterol responsive element » (SRE) pour activer la transcription de ses gènes cibles tels que la HMGCR et le LDLR (Figure 9), favorisant ainsi la biosynthèse et l'absorption du cholestérol.

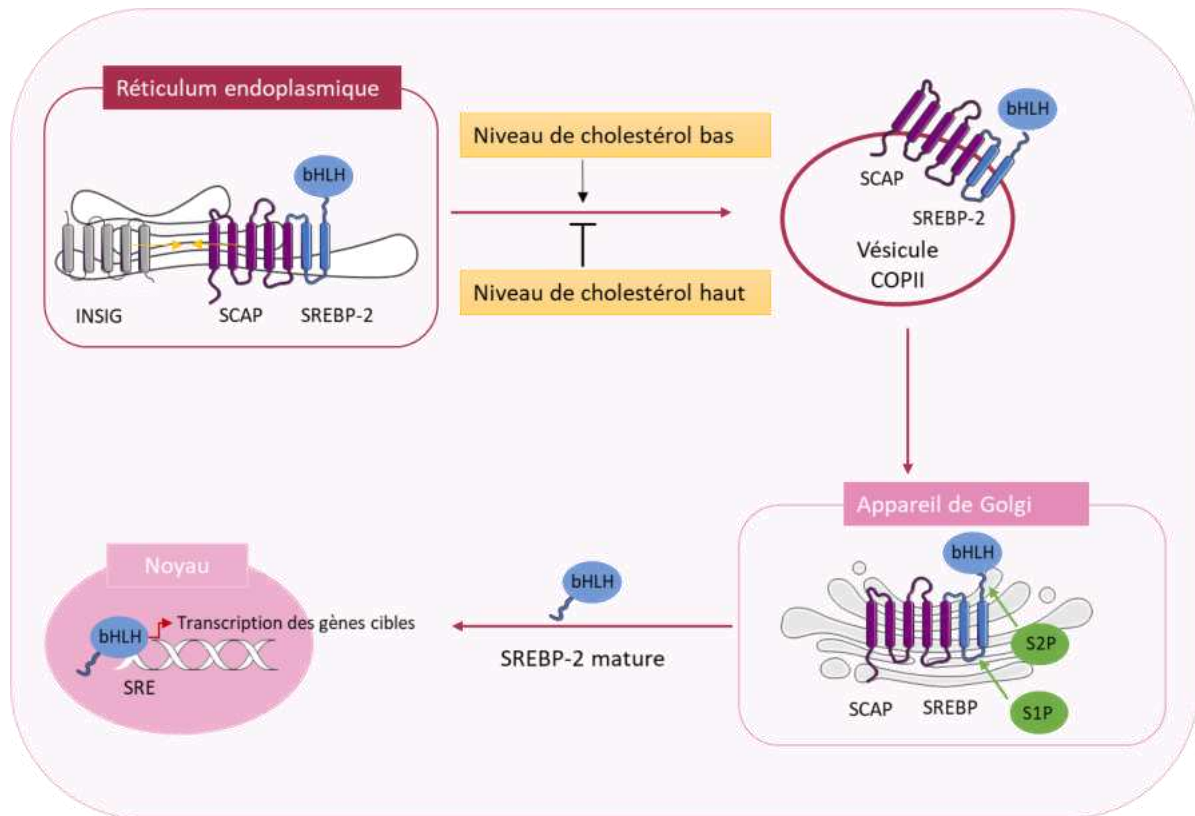


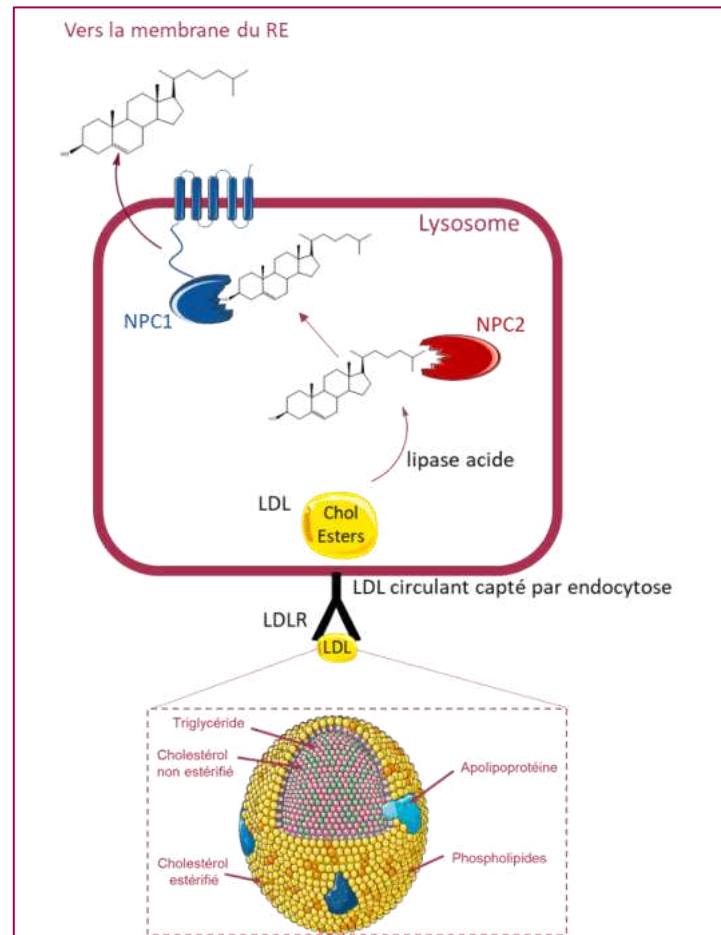
Figure 9 : Au niveau du réticulum endoplasmique, SCAP (représenté en violet) et SREBP (représenté en bleu) s'associent pour former un complexe qui migre vers l'appareil de Golgi où SREBP subit un clivage protéolytique (représenté en vert). La forme mature de SREBP se dirige ensuite vers le noyau où il interagit avec l'élément de réponse aux stérols (SRE) et favorise l'expression de ses gènes cibles. En présence d'un excès de cholestérol intracellulaire, la migration du complexe SCAP-SREBP vers le noyau est entravée au niveau du réticulum endoplasmique.

## 1.6. Absorption du cholestérol par les cellules

Pour fonctionner correctement, les cellules ont besoin d'un apport extracellulaire de cholestérol. Le cholestérol provient du foie qui est l'organe gestionnaire du cholestérol dans l'organisme. En raison de sa nature hydrophobe, le cholestérol se lie aux lipoprotéines pour être transporté dans le plasma (Defesche 2004). Les lipoprotéines sont des particules complexes constituées d'un cœur lipidique hydrophobe contenant des esters de cholestérol et des triglycérides, recouvertes d'une couche périphérique moins hydrophobe, composée de phospholipides, du cholestérol libre et d'apolipoprotéines, formant ainsi des lipoprotéines solubles dans les milieux aqueux. Cette structure permet aux lipoprotéines de rester solubles dans les milieux aqueux et de transporter le cholestérol vers les tissus périphériques, principalement via les lipoprotéines de basse densité (LDL).

Les LDLs sont reconnues par LDLR exprimé à la surface des cellules, entraînant l'endocytose du complexe ligand/récepteur (G.-W. Go et Mani 2012). Dans les endosomes, l'acidification

progressive du pH permet la dissociation de la lipoprotéine du LDLR. Alors que le récepteur est recyclé à la membrane, la lipoprotéine est dégradée dans les lysosomes. La lipase acide lysosomale (LAL) hydrolyse les esters de cholestérol, libérant ainsi le cholestérol sous sa forme libre (Defesche 2004 Zhang 2018) . Ce dernier est pris en charge par les protéines Niemann-Pick type C1 et C2 (NPC1 et NPC2), qui le conduisent à la membrane plasmique ou à la membrane du réticulum endoplasmique (Vance et Peake 2011; J. Luo et al. 2017) (Figure 10). Le cholestérol libre résultant peut ainsi s'intégrer dans les membranes plasmiques, participant à leur organisation, servir de précurseur pour la synthèse des hormones stéroïdiennes, ou être stocké sous forme d'ester de cholestérol grâce à l'activité de l'enzyme l'acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) de type 1 et 2 (ACAT1/SOAT1 et ACAT2/SOAT2), et inhiber à la fois sa propre synthèse et celle des LDLR (C. Chang et al. 2006; T.-Y. Chang et al. 2006).



### 1.7. Élimination de l'excès de cholestérol

L'efflux du cholestérol des cellules est un processus crucial pour maintenir l'homéostasie du cholestérol intracellulaire. Bien que les cellules puissent stocker du cholestérol, elles ne peuvent pas le dégrader individuellement. Afin d'éviter l'accumulation cytotoxique du cholestérol à l'intérieur des cellules, il est essentiel d'assurer son transport des tissus périphériques vers le foie *via* la voie dite « transport inverse du cholestérol » (TIC) (Lund-Katz et Phillips 2010). Ce processus est régulé exclusivement par l'activation des récepteurs nucléaires, le LXR et/ou le RXR (Retinoid X Receptor) (voir section 3), activés respectivement par certains oxystérols et l'acide 9-*cis*-rétinoïque (Heyman et al. 1992; Peet, Janowski, et Mangelsdorf 1998a). Ces récepteurs modulent entre autres la transcription de certaines



protéines ABC (ATP-binding cassettes) impliquées dans cette voie de TIC. Parmi ces protéines, les ABCA1 (ATP-Binding Cassette A1) et ABCG1 (ATP Binding Cassette G1) jouent un rôle crucial dans l'efflux du cholestérol vers les apolipoprotéines pauvres en lipides et de son appariement avec les lipoprotéines de haute densité (HDL) (Venkateswaran et. 2000; Costet et al. 2000). Dans un second temps le cholestérol capté subit une estérification sous l'action de la LCAT (lecithin : cholesterol acyltransferase), permettant la formation du cœur hydrophobe et la génération de HDL matures pouvant interagir dans un second temps avec les ABCG1. Au niveau du foie ces HDL matures sont reconnues par les récepteurs SR-B1 (scavenger receptor B1) qui assurent l'absorption des esters de cholestérol par un processus d'absorption sélective (Figure 11). Les esters de cholestérol ainsi absorbés sont hydrolysés en cholestérol libre par la NCEH1 (Neutral cholesterol ester hydrolase 1) (T.-Y. Chang et al. 2006). Enfin, le cholestérol des HDL peut être capté sélectivement par les hépatocytes et éliminé par voie biliaire (Acton et al. 1996; Ganesan et al. 2016) .

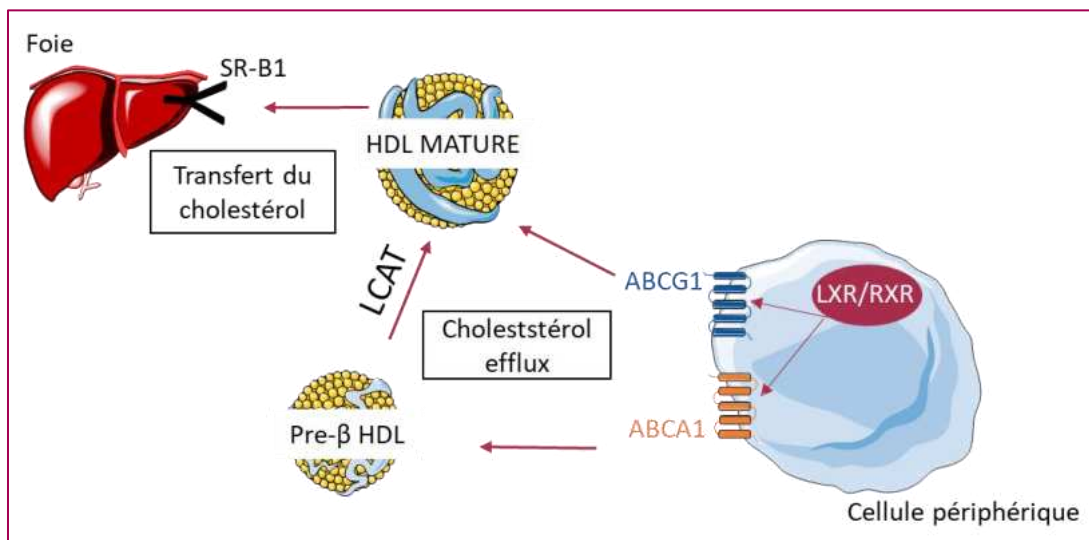


Figure 11 : L'efflux du cholestérol des cellules des tissus périphériques vers le foie via le transport inverse du cholestérol.

### 1.8. Pathologies liées au cholestérol

Des maladies génétiques résultent de l'inactivation de gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol (voir tableau 1 et figure 12). Des mutations nulles sur ces enzymes entraînent une accumulation des substrats de ces enzymes et donc des intermédiaires dans la voie de biosynthèse du cholestérol (F. D. Porter et Herman 2011). Le syndrome le plus courant parmi ces troubles génétiques est la déficience de la DHCR7, enzyme

qui intervient dans l'étape finale de la biosynthèse du cholestérol dans la voie de Kandutsch–Russell, connue sous le nom de syndrome de Smith–Lemli–Opitz (SLO) premièrement décrit par les Docteurs Smith, Lemli, et Opitz (Salen et al. 1996). Cette déficience résulte de mutations du gène codant pour la DHCR7 qui altèrent de façon plus ou moins importante son activité enzymatique (Figure 12). Par conséquent, le SLO est associé non seulement une diminution du taux de cholestérol, mais également à une augmentation du taux de son précurseur, le 7-dehydrocholestérol (7-DHC) qui continue d'être synthétisé en réponse au niveau faible de cholestérol. La DHCR7 intervient aussi dans la voie de Bloch pour convertir le 7-dehydrodesmostérol en desmostérol qui est ensuite converti en cholestérol par la DHCR24. Le fait que la déficience en DHCR7 entraîne une accumulation de 7-DHC plutôt que de 7-déhydrodesmostérol est interprété comme révélateur que la voie Kandutsch–Russell est la voie principale de biosynthèse de cholestérol. Cependant, le desmostérol est également un précurseur retrouvé dans certains tissus tel que la rate et les glandes surrénales (Mitsche et al. 2015). Dans ce cas le 7-déhydrodesmostérol qui s'accumule peut probablement être métabolisé par la DHCR24 pour former du 7-DHC par la voie Kandutsch–Russell hybride suggérée dans l'étude de Mitsche (Mitsche et al. 2015). Cliniquement, le syndrome de SLO se caractérise chez le patient par une malformation cranio-faciale ainsi qu'une malformation de plusieurs organes comme le cerveau, le cœur et les poumons, et ce syndrome conduit à une mort périnatale ou au début de l'âge adulte (R. I Kelley 2000). Ces caractéristiques morphologiques observées sont extrêmement similaires au phénotype résultant de mutations dans les effecteurs de la voie de signalisation de Sonic Hedgehog (SHH). Cette voie joue un rôle crucial dans la régulation de divers aspects de l'embryogenèse, de la croissance à la spécification des types cellulaires, la prolifération et la survie. Des études montrent que la synthèse du cholestérol par la DHCR7 est essentielle pour une activation optimale de la voie de signalisation SHH, et l'absence de cholestérol entrave cette voie, conduisant au développement du syndrome SLO (Roux et al. 2000 ; Waterham 2006 ; Blassberg et al. 2016). La question est de déterminer si ce phénotype clinique observé résulte du déficit en cholestérol ou plutôt à l'accumulation cellulaire de 7-DHC. Deux études ont apporté des données en faveur de la première hypothèse. Premièrement, le phénotype clinique d'un modèle de rat SLO a été amélioré par un régime riche en cholestérol (Gaoua et al. 2000). Deuxièmement, un essai clinique a montré que les enfants atteints de SLOS nourris avec un régime supplémenté en cholestérol pendant quelques mois présentaient une amélioration de



leur croissance (Irons et al. 1997 ; Elias et al. 1997). Cependant, toutes les études ne sont pas en accord. Une étude menée sur une longue période pendant 6 ans sur des sujets SLO n'a montré aucune amélioration des compétences cognitives, motrices ou adaptatives en réponse à la supplémentation en cholestérol (Sikora et al. 2004) ), ce qui pourrait être expliqué par l'incapacité du cholestérol à franchir la barrière hémato-encéphalique. De plus, des souris présentant une synthèse de cholestérol non régulée en raison de l'élimination des protéines régulatrices INSIG ont montré une accumulation d'intermédiaires post-lanostérol dans la voie de biosynthèse du cholestérol, entraînant une fente faciale rappelant le phénotype SLO (Engelking et al. 2006). Le traitement adopté jusqu'à présent inclut généralement l'administration de statines (Simvastatin) qui a démontré une capacité à franchir la barrière hématoencéphalique et à réduire les concentrations circulantes de 7-DHC et de 8-DHC chez les sujets traités, en complément de la supplémentation en cholestérol (Y.-M. Chan et al. 2009). Inversement, des mutations dans le gène codant DHCR24 (Figure 12), intervenant lors de la dernière étape de la voie de Bloch, induisent une diminution du taux du cholestérol et l'accumulation du desmostérol, conduisant à l'apparition d'une pathologie rare, la desmostérolose. Cette maladie a un impact dramatique sur le développement, engendrant des malformations et des microcéphalies, compromettant très tôt le pronostic vital après la naissance (Schaaf et al. 2011; Waterham 2006). La protéine de liaison à l'emopamil (EBP, qui est l'enzyme 3- $\beta$ -Hydroxystéroïde-Delta (8), Delta(7)-isomérase), tire son appellation de sa forte affinité avec l'emopamil, un bloqueur des canaux calciques. Dans la voie de biosynthèse du cholestérol l'EBP intervient dans les deux voies post-lanostérol, et présente une activité d'isomérase stéroïdienne, transférant la double liaison de la position C9-C8 à la position C8-C7 dans le cycle B des stérols. Plus spécifiquement, l'EBP convertit le zymosténol en lathostérol et le zymostérol en dehydrolathostérol (Mazein et al. 2013). Cependant, l'EBP peut intervenir sur d'autres intermédiaires stéroïdiens dans des contextes particuliers. Dans le syndrome SLO, la mutation affectant l'enzyme DHCR7, entraîne l'augmentation des niveaux de 7-DHC. À mesure que le 7-DHC s'accumule, il peut servir de substrat pour l'EBP, qui catalyse également l'isomérisation de la double liaison C7-C8 dans le sens inverse. Par conséquent, SLO présente également des niveaux élevés de 8-dehydrocholestérol (8-DHC) (Paik et al. 1986 ; Batta et al. 1995). Cependant, les mutations dans le gène EBP sont responsables du développement du syndrome de Conradi-Hünemann-Happle (Figure 12), une forme de chondrodysplasie ponctuée dominante liée à l'X (CDPX2). Seules les filles sont atteintes car le défaut génétique

lié à l'X est létal chez les garçons hémizygotes (Happle 1979). CDPX2 entraîne généralement un déficit de croissance, une petite taille et une courbure de la colonne vertébrale et certaines formes peuvent également affecter la peau, les cheveux et les yeux (cataracte le plus souvent) (Braverman et al. 1999b; Hello et al. 2010). La mutation de l'EBP induit une accumulation du 8-déshydrocholestérol (8-DHC) et du zymosténol dans le plasma et les tissus (Braverman et al. 1999). L'accumulation observée du zymosténol, plutôt que le zymostérol, est attribué à la capacité du zymostérol à être un substrat efficace de la DHCR24 et est donc converti en zymosténol, qui s'accumule par la suite en raison de la déficience de l'EBP. Il est supposé que l'accumulation du 8-DHC résulte de l'activation de la lathostérol 5-desaturase (SC5D) en réponse aux niveaux élevés de zymosténol (Richard I. Kelley et al. 1999; Herman et al. 2002; Has et al. 2002; Whittock et al. 2003). Une récente étude de 2021 a révélé que la surexpression ou la mutation de l'EBP peut réguler négativement la signalisation Hedgehog en influençant la cholestérylation de SMO, une étape cruciale de son activation. Toutefois, cette régulation semble indépendante de son activité enzymatique (Qiu, Hu, et Song 2021). Il est intéressant de noter que les anomalies observées chez les patients atteints de CDPX2 rappellent également les anomalies associées à une signalisation anormale de Hedgehog, suggérant que des dysfonctionnements dans le mécanisme de SMO pourraient contribuer à la survenue de la CDPX2 (Qiu, Hu, et Song 2021).

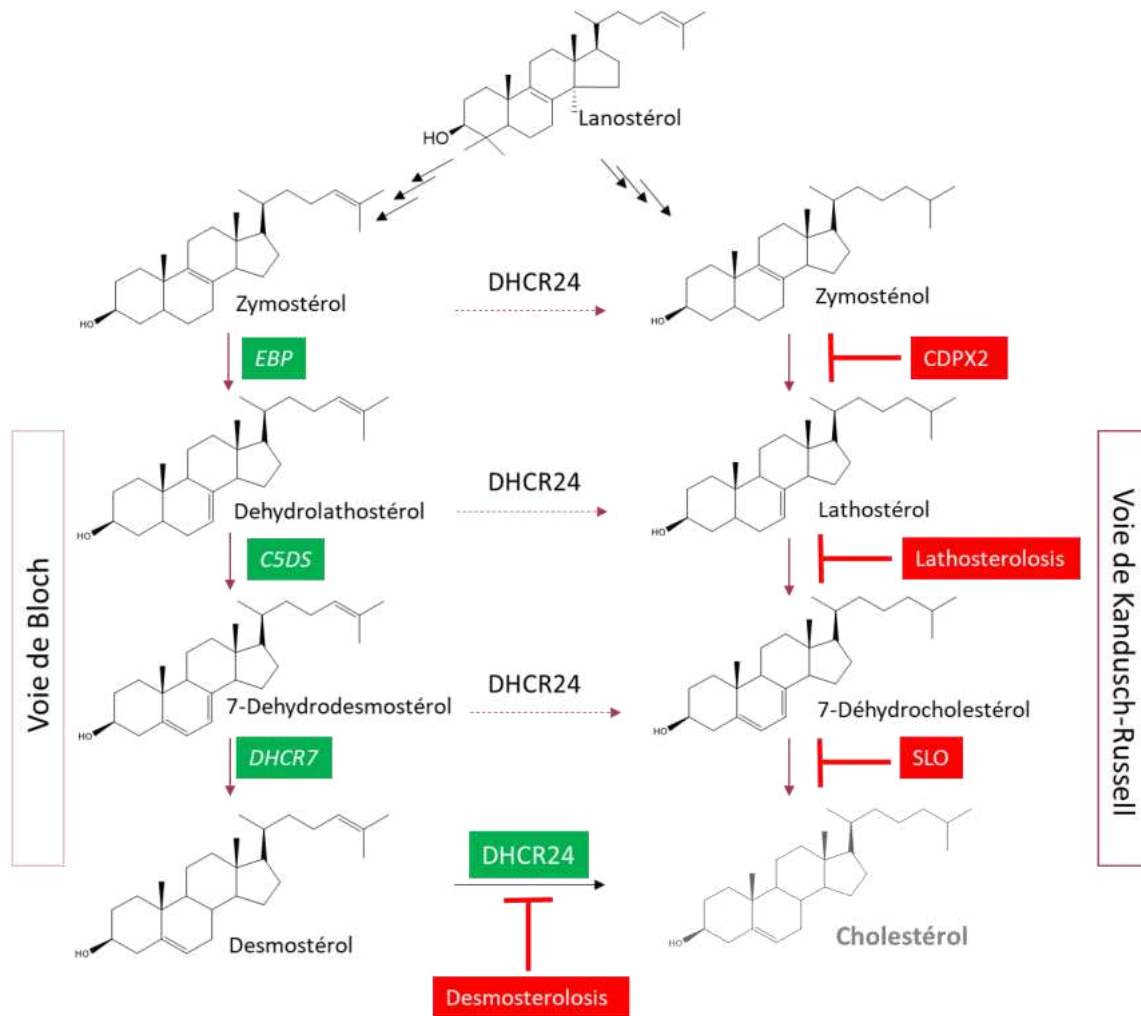


Figure 12 : Schéma post-lanostérol dans la biosynthèse du cholestérol, mettant en avant les différentes enzymes en vert et les maladies associées à leurs déficiences sont indiquées en rouge.

Tableau 1: Syndromes génétiques résultants de la déficience d'enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol.

Mutation, gène	Pathologies	Référence OMIM	Description	Stérols majoritaires	Références
DHCR7	Smith-Lemli-Opitz syndrome	#270400	Anomalies congénitales multiples, déficit intellectuel et troubles comportementaux.	7-Dehydrocholesterol 8-dehydrocholesterol	Salen et al. 1996 Paik et al. 1986 Batta et al. 1995
DHCR24	Desmosterolosis syndrome	#602398	Caractérisée par de multiples malformations, visage dysmorphique et une fente palatine	Desmostrol	Schaaf et al. 2011 Waterham 2006
SC5D	Lathosterolosis syndrome	#607330	Diverses malformations, retard mental et d'un dysfonctionnement hépatique	Lathosterol	Brunetti-Pierri et al. 2002
EBP	X-linked dominant chondrodysplasia punctata-2 (CDPX2) syndrome	#302960	Nanisme, asymétrie de la longueur des membres et une scoliose, défauts de la peau, des cheveux et des yeux	Zymostenol 8-dehydrocholesterol	Happle 1979 Braverman et al. 1999
NSDHL	CHILD (Congenital hemidysplasia with ichthyosiform erythroderma and limb defects ) et CK (d'après les initiales du sujet initial) syndromes	#308050 #300831	CHILD: Maladie dominante liée à l'X avec naevus ichtyosiforme (anomalie du développement embryonnaire) caractérisée par des lésions cutanées généralement unilatéral apparaissant à la naissance ou peu après, affectant souvent un membre ou une moitié du corps du même côté. CK: Trouble récessif lié à l'X caractérisé par un déficit cognitif, des crises et des malformations.	C4-Methylsterols	König et al. 2000 McLarren et al. 2010
CYP51A1	Antley-Bixler syndrome	#201750	Un syndrome rare caractérisé par une craniosynostose avec sous-développement de la partie médiane du visage, une fusion des os radio-ulnaires, une courbure du fémur et des raideurs articulaires.	Lanosterol, 24,25-dihydrolanosterol	Bai, Li, et Wang 2017

## 2. Métabolites primaires du cholestérol

### 2.1 Les Oxystérols

Les oxystérols sont des molécules qui résultent d'une mono- ou d'une poly-oxygénation du cholestérol, qui conservent la structure fondamentale du noyau stérol tout en comportant 27 atomes de carbone, auxquels peuvent s'ajouter un ou plusieurs atomes d'oxygène. Les groupements fonctionnels oxygénés couramment ajoutés lors de l'oxydation incluent les groupements hydroxyles (-OH), cétones (=O), hydroperoxydes (-O-O-H) et époxydes (cycle à trois atomes). Les oxystérols peuvent être classés en deux catégories : oxystérols primaires, formés par oxydation soit sur le noyau stéroïdien, les ROX : « ring oxysterols » (A-ROX, B-ROX) soit sur la chaîne latérale, les SCOX : « side chain oxysterols », et les oxystérols secondaires, qui présentent plus d'une modification, les mixtes (SCOX-ROX). Ainsi, la diversité structurale des oxystérols résulte de la position et du nombre de ces groupements fonctionnels oxygénés ajoutés sur la molécule de cholestérol (Souidi et al. 2004; Griffiths et Wang 2019). L'introduction de groupements oxygénés supplémentaires rend les oxystérols plus polaires que le cholestérol. Comme pour le cholestérol, les oxystérols peuvent s'incorporer dans les membranes mais se déplacent plus rapidement. Ce déplacement rapide au sein de la bicouche lipidique a été attribué à une meilleure solvatation résultant des interactions électrostatiques entre les groupements oxygénés et le compartiment aqueux (Xiang et Anderson 2002), ainsi qu'à des interactions faibles avec les phospholipides environnants, induisant une perturbation dans l'emballage lipidique membranaire (Vila, Korytowski, et Girotti 2001). Cette caractéristique favorise le déplacement des oxystérols dans les membranes, ce qui les rend plus facilement accessible aux protéines cytoplasmiques de la famille OSBP (Oxysterol Binding Protein) et ORP (Oxysterol-binding protein related-proteins) (Massey 2006). Les concentrations d'oxystérols dans la circulation sanguine sont de l'ordre de 10 à 200 ng/ml (25–500 nM), ce qui correspond à seulement 0,001 à 0,01 % du taux de cholestérol circulant, qui se situe autour du millimolaire (mM) (Brown et Jessup 1999; Mutemberezi et al. 2016). L'augmentation du taux d'oxystérols dans les tissus est associée à différentes pathologies telles que l'athérosclérose et les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Sottero et al. 2019a).

## 2.2. Formation des oxystérols

Le cholestérol est susceptible de subir une variété de réactions d'oxydation impliquant à la fois des mécanismes enzymatiques et non-enzymatiques (Bösinger et al. 1993), ce qui conduit la formation d'oxystérols. Les oxystérols formés par l'oxydation de la chaîne latérale isooctyle en C17 du cholestérol, sont principalement générés par l'action d'enzymes appartenant à la famille des cytochromes P450. En revanche, l'oxydation du cycle stéroïdien, se produit exclusivement sur le cycle A et B et génère des oxystérols formés principalement par voie non-enzymatique, due à la sensibilité de la double liaison entre les carbones C5-C6 et des hydrogènes allyliques en position C4 et C7. Ce processus génère des hydroperoxydes de cholestérol (ChOOH), des hydroxydes de cholestérol (ChOH), et céto-cholestérol (Ch=O) et les époxydes en 5,6 du cholestérol (5,6-ECs) (R. C. Murphy et Johnson 2008a; Brown, Sharpe, et Rogers 2021). À l'exception du 25-Hydroxycholestérol (25-HC) et le 7 $\alpha$ -Hydroxycholestérol (7 $\alpha$ -HC) ainsi que les 5,6-ECs, ces oxystérols peuvent être produits à la fois par voie enzymatiques et non-enzymatiques (L. L. Smith 1987). En plus de cette production endogène, les oxystérols peuvent avoir également une origine exogène par un apport alimentaire riche en cholestérol et peuvent être générés par divers mécanismes, y compris le stockage, processus de fabrication et la cuisson des aliments (Bösinger, Luf, et Brandl. 1993).

En 2005, l'introduction du système de classification LIPID MAPS a permis de créer une base de données complète de ces lipides, appelée [LIPID MAPS](#) Structure Database (LMSD). Actuellement, cette base de données recense plus de 40 000 structures de lipides provenant de diverses sources vérifiées et régulièrement actualisée. En plus des structures, la LMSD offre des informations détaillées sur chaque molécule, telles que les noms communs et systématiques, les synonymes, la formule moléculaire, la masse exacte, et l'ID, entre autres. Les structures dans la LMSD sont soit générées automatiquement par des outils de dessin de structures développés par LIPID MAPS soit dessinées manuellement à l'aide d'un logiciel de dessins moléculaire en 2D ou 3D appelé ChemDraw (Fahy et al. 2011). Ces deux sources (LIPID MAPS et ChemDraw) ont été utilisées dans ce manuscrit.

### 2.2.1. Formation des oxystérols par voie non-enzymatique

#### I. Formation par voie non-enzymatique des hydroperoxydes et dérivés

Le terme "auto-oxydation" sera employé pour faire référence à l'oxydation non-enzymatique, un processus faisant partie des réactions chimiques contribuant à la formation des dérivés oxydés du cholestérol. Dans le contexte cellulaire, l'auto-oxydation du cholestérol peut être initiée par des espèces radicalaires (ou réactives) à l'oxygène (ROS), nous parlons alors d'auto-oxydation de type I dont les plus décrits sont l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), le radical hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou encore les espèces réactives de l'azote (RNS), l'oxyde nitrique (NO) et le peroxynitrites ( $ONOO^{\bullet}$ ). Ces radicaux peuvent être générés par le métabolisme cellulaire ou résulter de la décomposition successive de précurseurs en radicaux libres, tels que dans la réaction de Fenton (Figure 13B) qui produit le radical hydroxyle ( $HO^{\bullet}$ ), pouvant amorcer la chaîne radicalaire impliquant trois étapes fondamentales d'initiation, de propagation et de terminaison (Figure 13A). Ces radicaux libres interagissent avec les lipides polyinsaturés présents dans la membrane cellulaire, ce qui entraîne la formation d'un radical lipidique ( $L^{\bullet}$ ). Ce radical peut ensuite réagir avec l'oxygène pour former un peroxyde lipidique ( $LOO^{\bullet}$ ). Les peroxydes formés lors de la propagation peuvent réagir à leur tour avec le cholestérol ou avec d'autres radicaux libres, des antioxydants endogènes tel que la vitamine E ou rencontrer un second radical peroxyde et former un tétra oxyde. Ce tétra oxyde se décompose ensuite pour produire un composé carbonyle et de l'oxygène singulet selon le mécanisme de Russel (Figure 13 C,D), ce qui permet de terminer la chaîne en produisant des composés plus stables et non réactifs.

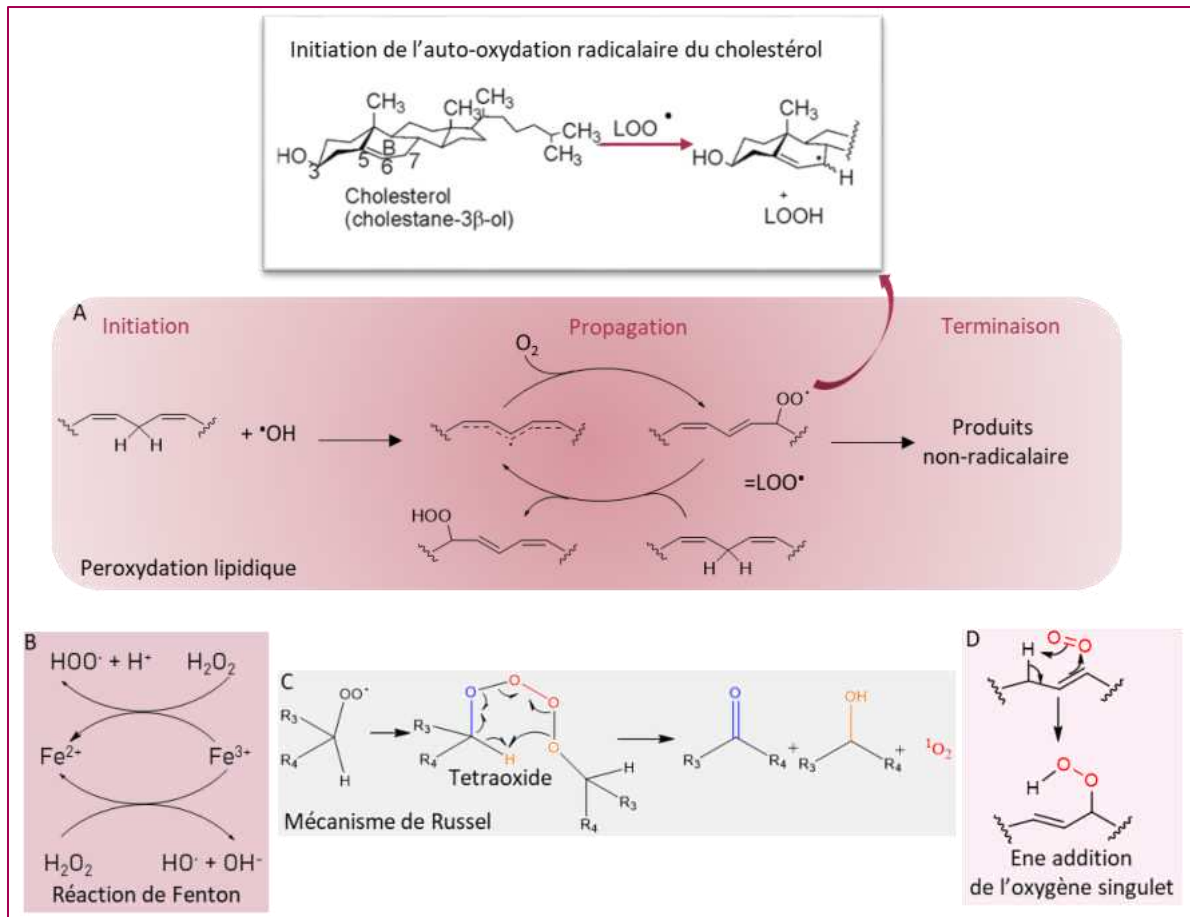


Figure 13 : Les étapes principales de la peroxydation lipidique ; A: Indication d'un mécanisme principal d'initiation ; B: réaction de Fenton ; C: mécanisme de terminaison de Russel ; D: Réaction de l'oxygène singulet avec les lipides insaturés.

Alternativement, l'auto-oxydation peut également se produire de manière stœchiométrique par des espèces non-radicalaires comme l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ), l'hypochlorite ( $\text{HOCl}$ ) et l'ozone ( $\text{O}_3$ ), ce qui est catégorisé comme auto-oxydation de type II. La principale distinction entre l'auto-oxydation de type I et de type II réside dans le mécanisme et les produits générés : le type I procède via un mécanisme de réaction en chaîne, tandis que le type II procède de manière stœchiométrique (R. C. Murphy et Johnson 2008b; Iuliano 2011; Zerbinati et Iuliano 2017). L'attaque directe par des espèces radicalaires réactives à l'oxygène sur le cholestérol comme le radical hydroxyle entraînent l'abstraction du proton allylique en position C7 due à la faible liaison C-H en cette position (énergie de dissociation 88 kcal/mol). Ceci entraîne la formation d'un radical libre en cette position (Zerbinati et Iuliano 2017). Ce radical est assez stable pour rencontrer une molécule de dioxygène à l'état triplet ( $^3\text{O}_2$ ) et former un radical peroxy ( $\text{COO}\cdot$ ), qui va arracher un hydrogène d'un acide gras polyinsaturé par exemple et conduire à la formation des  $7\alpha$ - et  $7\beta$ - hydroperoxycholestérol ( $\text{Chol } 7\alpha\text{-OOH}$  et  $\text{Chol } 7\beta\text{-OOH}$ ).



OOH). Ces hydroperoxydes sont des intermédiaires instables et sont convertis en plusieurs produits secondaires. Ils peuvent être réduits par des agents réducteurs tel qu'une peroxydase et le Fer II en radicaux alkyloxyde ( $\text{CO}\cdot$ ). Ces radicaux peuvent soit donner du  $7\alpha$ -Hydroxycholestérol ( $7\alpha$ -HC) et du  $7\beta$ -Hydroxycholestérol ( $7\beta$ -HC) par arrachement d'un hydrogène soit terminer la chaîne radicalaire par réaction avec un radical hydroperoxyde lipidique pour former du 7-Céto-cholestérol (7-KC). Ce dernier peut également être formé à partir du Chol  $7\alpha$ -OOH et du Chol  $7\beta$ -OOH par déshydratation et par le "mécanisme de Russell" (Figure 14) (R. C. Murphy et Johnson 2008a; Iuliano 2011). Ces trois oxystérols  $7\alpha$ -HC,  $7\beta$ -HC, 7-KC oxydés en C7 sont ceux formés majoritairement par auto-oxydation du cholestérol (Brown et Jessup 2009). L'accumulation du 7-KC a été impliquée dans différentes pathologies. La pathologie la plus fréquente impliquant le 7-KC est l'athérosclérose, il représente plus de 50% des oxystérols retrouvés dans le plasma des patients hypercholestérolémique et au niveau des plaques d'athérome. L'accumulation du 7-KC a été constatée également dans des pathologies associées au vieillissement telles que la maladie d'Alzheimer, la cataracte et la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Cette augmentation du 7-KC a été identifiée dans le plasma et les tissus des patients atteints de maladies rares telles que le syndrome SLO, la maladie de Niemann-Pick (NPC) ainsi que chez les patients atteints de formes sévères d'adrénoleucodystrophie liée à l'X. *In vitro*, il a été rapporté que le 7-KC induit une forme de cytotoxicité appelée oxiaoptophagie, qui peut être traduite en autophagie induite par stress oxydatif (Ghzaïel et al. 2022).

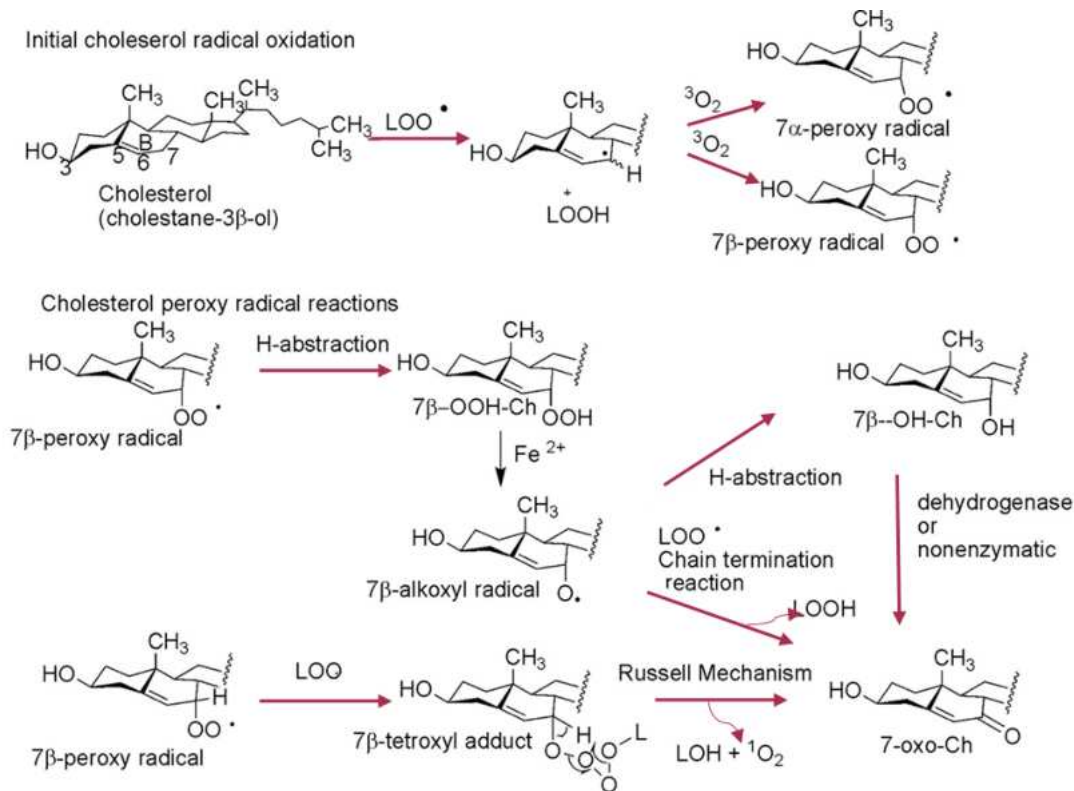


Figure 14 : Voies d'oxydation radicalaire du cholestérol par abstraction initiale d'un atome d'hydrogène en position C-7 et réactions des radicaux peroxydes formés.  $\text{LOO}^\bullet$  fait référence à un radical hydroperoxy lipidique intermédiaire ;  $\text{LOH}$  fait référence à un lipide hydroxy ;  $\text{LOOH}$  fait référence à un hydroperoxyde lipidique ; et  $\text{LO}^\bullet$  fait référence à un radical alkoxy lipidique intermédiaire. Adaptée de Murphy et Johnson 2008.

Dans les réactions d'auto-oxydation de type II, d'autres hydroperoxydes primaires de cholestérol sont formés entre l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) et la double liaison en position C5-C6 par la réaction "ene addition" à savoir : le cholestérol 5α-hydroperoxyde (Chol 5α-OOH), le cholestérol 6α- hydroperoxyde (Chol 6α-OOH) et le cholestérol 6β-hydroperoxyde (Chol 6β-OOH), parmi lesquels le Chol 5α-OOH est majoritaire aux Chol 6α/β-OOH (Frimer 1979; Terao 2014). Le Chol 5α-OOH peut se réorganiser par réarrangement allylique en Chol 7α-OOH et 7β-OOHC, qui sont thermodynamiquement plus stables (Figure 15) (Beckwith et al. 1989; Girotti et Korytowski 2000).

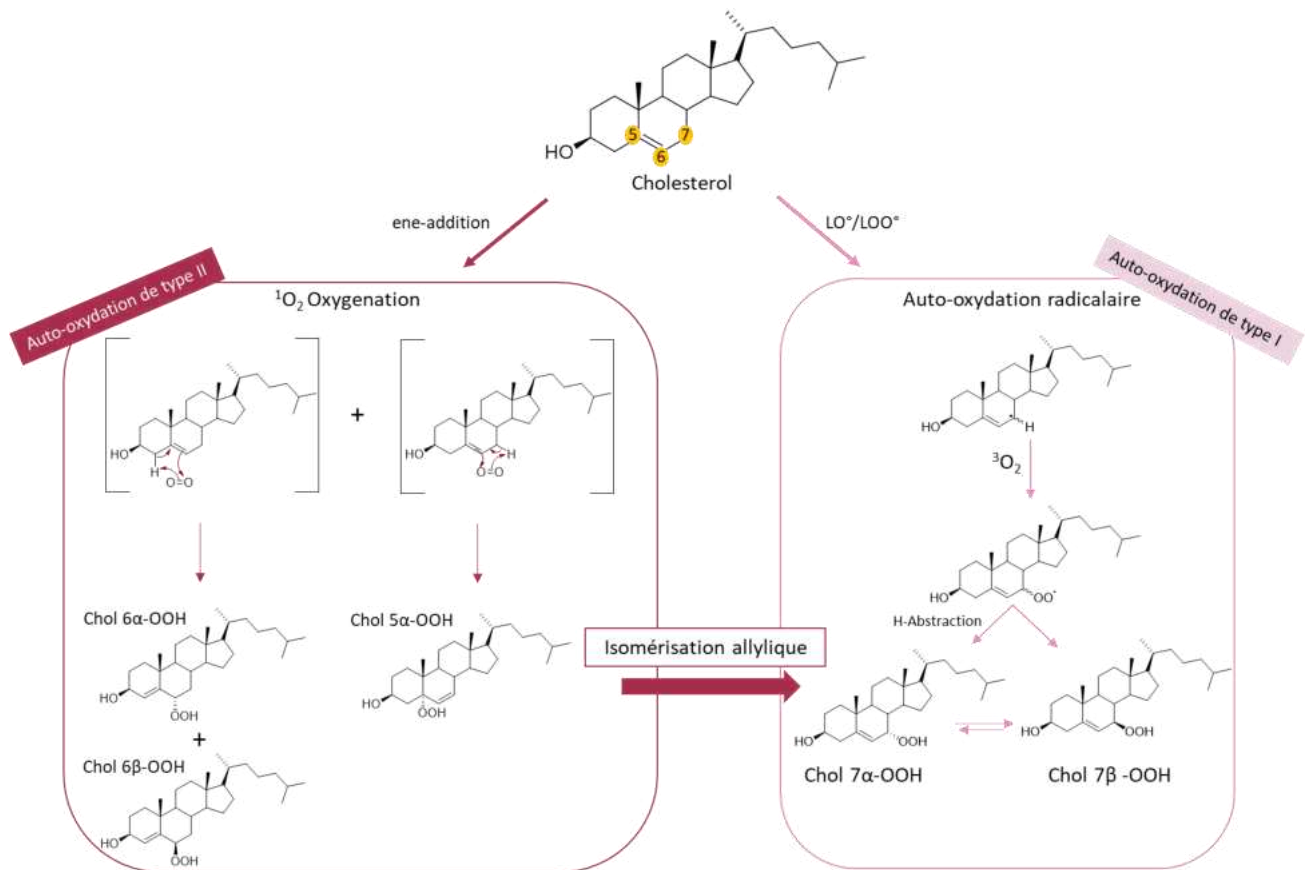


Figure 15 : Différentes voies de formation des hydroperoxydes de cholestérol (Chol OOH) via l'oxygénation par l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) et l'oxydation par des radicaux libres.

Le Chol 5 $\alpha$ -OOH est identifié comme le précurseur du sécostérol A et B, également connus sous le nom d'Athéronal-A et Athéronal-B, respectivement. Ces sécostérols aldéhydiques sont générés par clivage de la liaison C5-C6 du 5 $\alpha$ -ChOOH selon le mécanisme de rupture de Hock (Figure 16) (Brinkhorst, Nara, et Pratt 2008; Uemi et al. 2009; Tomono et al. 2009). Des études antérieures ont démontré que les sécostérols sont formés par l'ozonolyse directe du cholestérol, induisant le clivage de la double liaison C5-C6, conduisant à la production de l'Athéronal-A. Ce dernier, par une réaction d'aldolisation intramoléculaire, conduit à la formation de l'Athéronal-B (Smith 1987; Takeuchi et al. 2006; Tomono et al. 2009) (Figure 16). Ces observations ont conduit à proposer que l'Athéronal-B puisse servir de marqueur pour évaluer l'exposition à l'ozone dans les systèmes biologiques. Par ailleurs, des concentrations élevées de sécostérol-A et de sécostérol-B ont été identifiées dans les plaques athéromateuses humaines ainsi que dans des échantillons de tissus cérébraux de patients atteints de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la démence à

corps de Lewy. Cette observation suggère que l'augmentation de ces composés pourrait être corrélée à des pathologies inflammatoires.

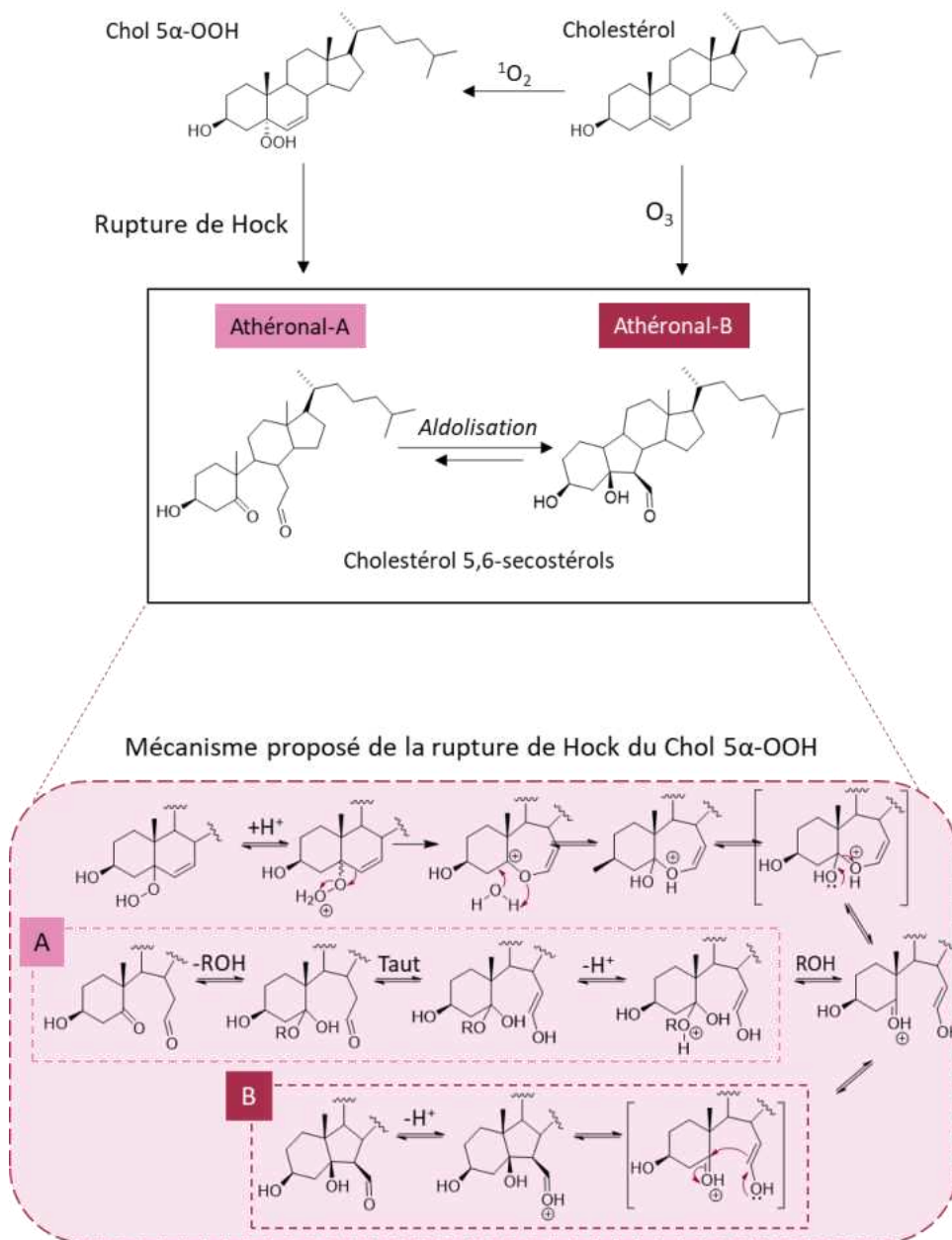


Figure 16 : Structures du cholestérol 5,6-sécostérols : l'Athéronal-A et l'Athéronal-B et leur formation à partir du cholestérol par réaction avec de l'ozone ( $O_3$ ) ou directement formés par clivage de Hock du cholestérol 5α-hydroperoxyde (Chol 5α-OOH).

Les hydrogènes allyliques situés en position C-4 du cholestérol représentent également une cible potentielle pour l'abstraction d'atomes d'hydrogène. Les deux épimères le 4α-Hydroxycholestérol et le 4β-Hydroxycholestérol (4α-HC et 4β-HC) ont été détectés *in vitro* à des niveaux comparables par oxydation des LDL et dans les plaques athéromateuses humaines

(Breuer et al. 1996). De plus le 4 $\beta$ -HC a été identifié également *in vivo* dans le foie de rat et le plasma humain. Le mécanisme d'oxydation en C-4 est essentiellement le même que celui en position C7 (Dzeletovic et al. 1995). De plus les études menées par Pratt et Zielinski (Zielinski et Pratt 2016; 2019) appuyées par des simulations de modélisation moléculaire, ont apporté une compréhension supplémentaire à la formation des épimères ChOOH : Chol 4-OOH, Chol 5-OOH, Chol 6-OOH, Chol 7-OOH (Figure 17), en analysant les enthalpies et les barrières énergétiques des états de transition. Les calculs sur les cycles A et B du cholestérol indiquent que la liaison de l'hydrogène allylique en C4-H est environ 6 kcal/mol plus énergétique que celle en C7-H (89,0 et 83,2 kcal/mol respectivement), favorisant ainsi la position C7. Il en découle également que l'abstraction de l' $\alpha$ -H en C7 est énergétiquement favorisée par rapport à l'abstraction du  $\beta$ -H, en raison de la gêne stérique induite par le groupement  $\beta$ -CH<sub>3</sub> en C10. De plus, la proximité du groupe hydroxyle en C3 favorise l'abstraction de  $\beta$ -H en C4 grâce à la formation d'une liaison hydrogène entre l'hydroxyle et le radical peroxy, ce qui abaisse ainsi la barrière énergétique nécessaire à l'abstraction de l'atome d'hydrogène (Figure 18). En revanche, l'abstraction de l' $\alpha$ -H en C4 est défavorisée énergétiquement car elle est dépourvue de cette interaction, probablement en raison de la position équatoriale de l'hydroxyle en C3. L'addition du radical peroxy en C5 ou C6 est influencée par deux facteurs : premièrement, l'addition en C5 génère un radical alkyle secondaire en C6, tandis que l'addition en C6 produit un radical alkyle tertiaire plus stable en C5. De plus, la contrainte stérique imposée par le groupement méthyle en C10 favorise l'addition en C5 du côté  $\alpha$  et uniquement en présence d'un bon donneur d'atome d'hydrogène, tandis que l'addition en C6 est préférée du côté  $\beta$ . Cette étude a suggéré que même si le Chol 6-OOH est un produit minoritaire, sa formation évoque une voie de production potentielle des sécostérols A et B, similaire à celle observée pour le Chol 5-OOH. Dans cette étude, Pratt et Zielinski ont décrit que lorsque le Chol 6 $\beta$ -OOH est soumis aux mêmes conditions que le Chol 5 $\alpha$ -OOH, seuls les sécostérols A et B ont été observés, indiquant un mécanisme de rupture de Hock (Hock Cleavage. 2010).

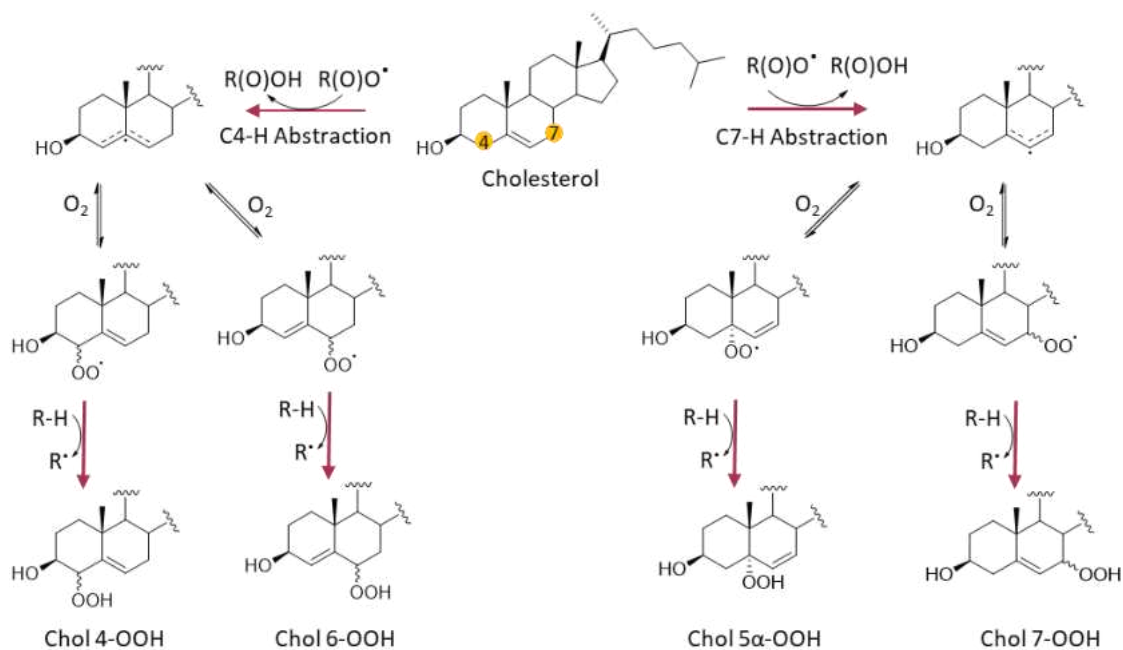


Figure 17: Voies d'autoxydation du cholestérol par abstraction d'atomes d'hydrogène conduisant à la formation d'hydroperoxydes épimères Chol 4-OOH, Chol 6-OOH, Chol 7-OOH et Chol 5α-OOH. Adaptée depuis (Zielinski et Pratt 2016; 2019)

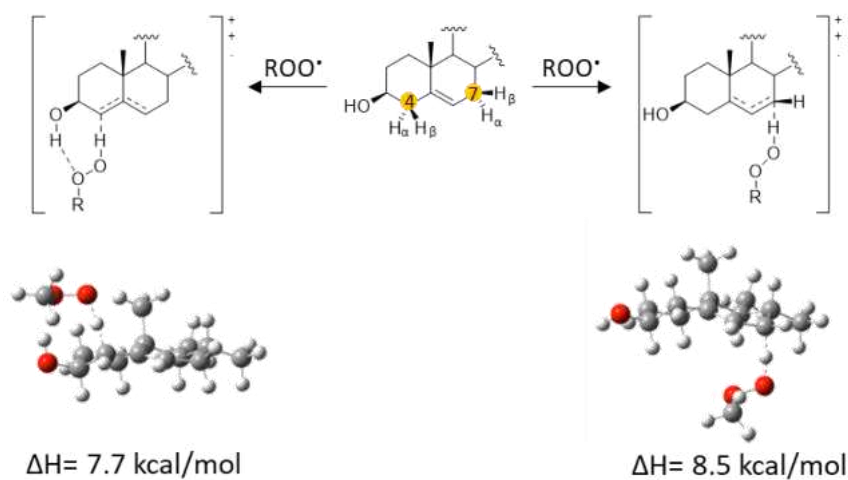


Figure 18 : Abstractions d'atomes d'hydrogène en C4 et C7 par un radical méthylperoxy et la structure de l'état de transition de plus basse énergie associées aux valeurs d'enthalpies en kcal/mol. Adaptée depuis (Zielinski et Pratt 2016; 2019)

## II. Formation par voie non-enzymatique des 5,6-époxycholestanoles (5,6-ECs)

En compétition avec l'abstraction des hydrogènes des positions allyliques en C4 et C7, la double liaison en position C5-C6 du cholestérol est la cible d'une oxydation radicalaire ou non radicalaire, ce qui conduit à la formation des 5,6-époxycholestanoles (5,6-ECs). Les époxydes sont des cycles à trois centres composés de deux atomes de carbone et d'un atome d'oxygène, formant une structure en triangle également appelée oxirane. Les 5,6-ECs existent sous forme de diastéréoisomères : le 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -époxycholestanol (5,6 $\alpha$ -EC) et le 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -époxycholestanol (5,6 $\beta$ -EC), dont la configuration dépend de l'orientation du groupe oxirane par rapport au plan du squelette stéroïdien. Ces 5,6-ECs font partie des oxystérols majoritaires formés par voie non-enzymatique retrouvés dans les tissus et fluides biologiques (Dzeletovic et al. 1995; Poirot et Silvente-Poirot 2013a; Sottero et al. 2019b). En effet, l'attaque d'un radical hydroperoxyde LOO $\cdot$  au niveau de la double liaison C5-C6 génère initialement un intermédiaire radicalaire alkyle en C5 (méthine) ou C6 (méthylène), avec le résidu hydroperoxyde en position 6 $\beta$  et 5 $\alpha$ , respectivement (Figure 19). Ces intermédiaires sont de courte durée et peuvent subir une substitution homolytique intramoléculaire (*SHi*) sur le groupe peroxyde, conduisant à la formation respective du 5,6 $\beta$ -EC et 5,6 $\alpha$ -EC, avec libération d'un radical alkoxy lipidique (Tadashi et al. 1984; Murphy et Johnson 2008). Le radical tertiaire méthine en C5 formé est plus stable que le radical secondaire méthylène en C6 ce qui oriente l'attaque sélective du radical hydroperoxyde sur la position C6 du noyau stéroïdien favorisant ainsi la formation majoritaire du 5,6 $\beta$ -EC par rapport au 5,6 $\alpha$ -EC, avec un ratio de 2-4:1 (Tadashi Watabe, Isobe, et Tsubaki 1982; Tadashi et al. 1984).



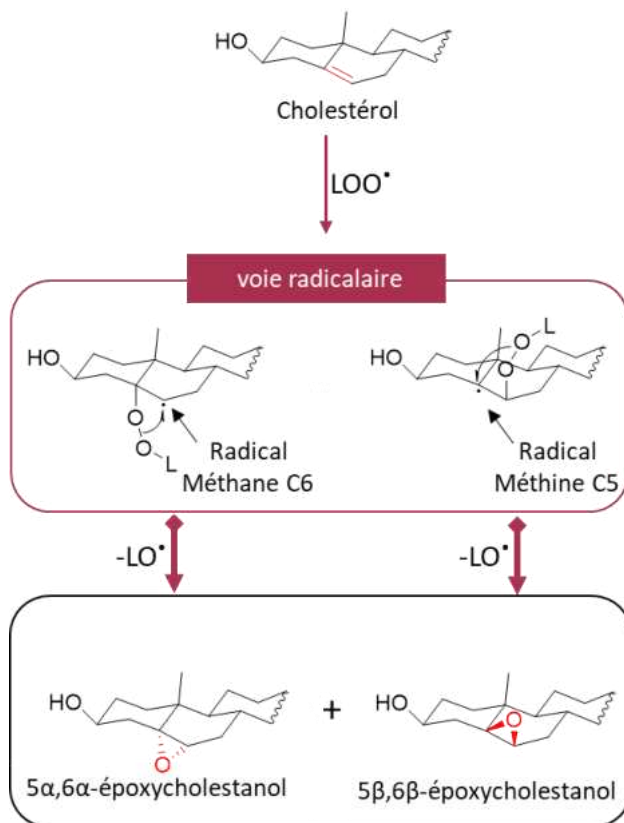


Figure 19: Formation des 5,6-époxycholestanols par voie radicalaire.

L'étude menée par Zielinski et Pratt (Zielinski et Pratt 2019), basée sur la modélisation moléculaire et le calcul d'énergie, a validé cette préférence liée à la stabilité des radicaux intermédiaires formés. Cependant, malgré la contrainte stérique due au groupement méthyle en C10, l'addition en C6 est favorisée sur la face  $\beta$  (17.6 kcal/mol) et l'addition en C5 sur la face  $\alpha$  (19.3 kcal/mol). Cette préférence s'expliquerait selon ces auteurs par l'adoption de la conformation « chaise » par les radicaux alkyles formés à l'état de transition, qui est énergétiquement la plus favorable. En revanche, les additions en C6 sur la face  $\alpha$  (17.9 kcal/mol) et en C5 sur la face  $\beta$  (22 kcal/mol) entraînent une conformation en « twist boat », plus élevée énergétiquement et donc défavorable (Zielinski et Pratt 2019).

Le mécanisme non-radicalaire proposé pour la formation des 5,6-ECs est basé sur l'époxydation connue des oléfines par les hydroperoxydes. Dans les systèmes biologiques, le cholestérol peut être estérifié par des acides gras polyinsaturés (PUFAs) (Spiteller 2006). Dans ce contexte, la réaction de peroxydation est initiée au niveau du PUFA, conduisant à la formation initiale d'un radical peroxyde. Ce radical peroxyde attaque par la suite la double liaison par une réaction intramoléculaire, conduisant à la formation des 5,6-ECs, accompagnée de la réduction du groupement hydroperoxyde en un groupement hydroxyde (Figure 20)



(Spiteller 2006; Murphy et Johnson 2008). Dans la même étude de (Zielinski et Pratt 2019) , ils ont démontré que l'époxydation du cholestérol par ce processus peut produire des ratios variables des deux diastéréoisomères, selon la présence d'un donneur de protons à proximité de la réaction. Cela suggère que la lipoperoxydation pourrait privilégier la formation de l'un ou de l'autre isomère en fonction du contexte biochimique dans lequel la réaction se déroule. Ces époxydes peuvent ensuite être hydrolysés par la cholestérol-5,6-époxyde hydrolase (ChEH) en cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT) qui peut lui-même être oxydé par la 11 $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase de type II (11 $\beta$ -HSD2) en 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol (OCDO) (Voisin et al. 2017).

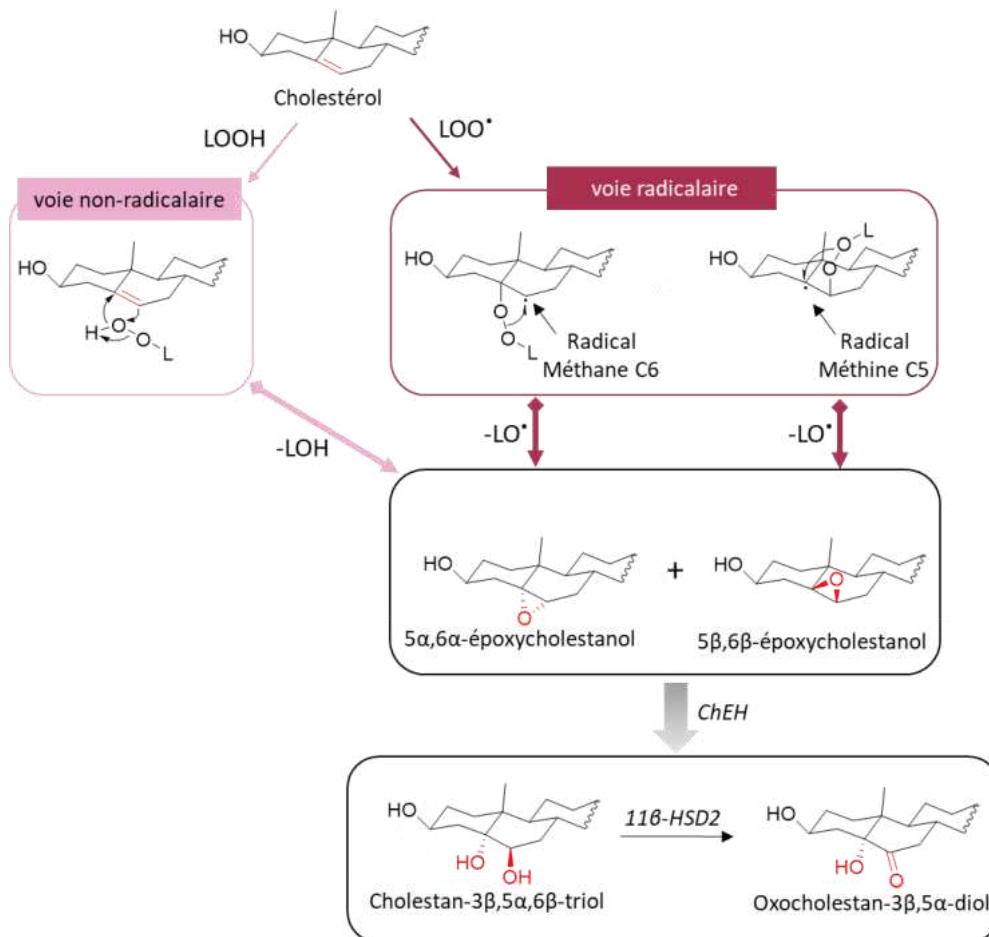


Figure 20: Les 5,6-ECs peuvent être formés par des mécanismes radicalaires et non-radicalaires. LOO• désigne un intermédiaire radical hydroperoxy lipidique ; LOH désigne un lipide hydroxylé ; LOOH désigne un lipide hydroperoxyde ; et LO• désigne un intermédiaire radical lipidique alkoxyle.

Les 5,6-ECs peuvent être formés par réaction du cholestérol avec diverses espèces moléculaires d'oxygène. Le rapport entre le 5,6 $\alpha$ -EC et le 5,6 $\beta$ -EC (5,6 $\alpha$ -EC:5,6 $\beta$ -EC) formé dépend de l'état électronique de l'oxygène. En effet, l'oxygène peut exister sous la forme de

plusieurs états électroniques qui auront des réactivités distinctes (Figure 21). Car en théorie, l'énergie d'activation pour la réaction directe du dioxygène ( $O_2$ ) dans son état fondamental dit « état triplet » ( $^3O_2$ ) avec les molécules possédant des électrons appariés est élevée, se situant entre 146 à 273 kJ.mol<sup>-1</sup>. En revanche, elle est plus favorisée avec des molécules ayant des électrons non-appariés (H. W. Gardner 1986; Schaich et al. 2013). Pour surmonter cette barrière énergétique, l'oxygène peut être transformé en formes plus réactives, il s'agit des espèces réactives de l'oxygène. Parmi ces états électroniques de l'oxygène (Figure 21), nous retrouvons l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), l'anion peroxyde ( $O_2^{2-}$ ), le cation dioxygényle ( $O_2^+$ ), le radical hydroxyle ( $^{\bullet}OH$ ), l'ozone ( $O_3$ ) et le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  (Vaska 1976 ; Bayr 2005).

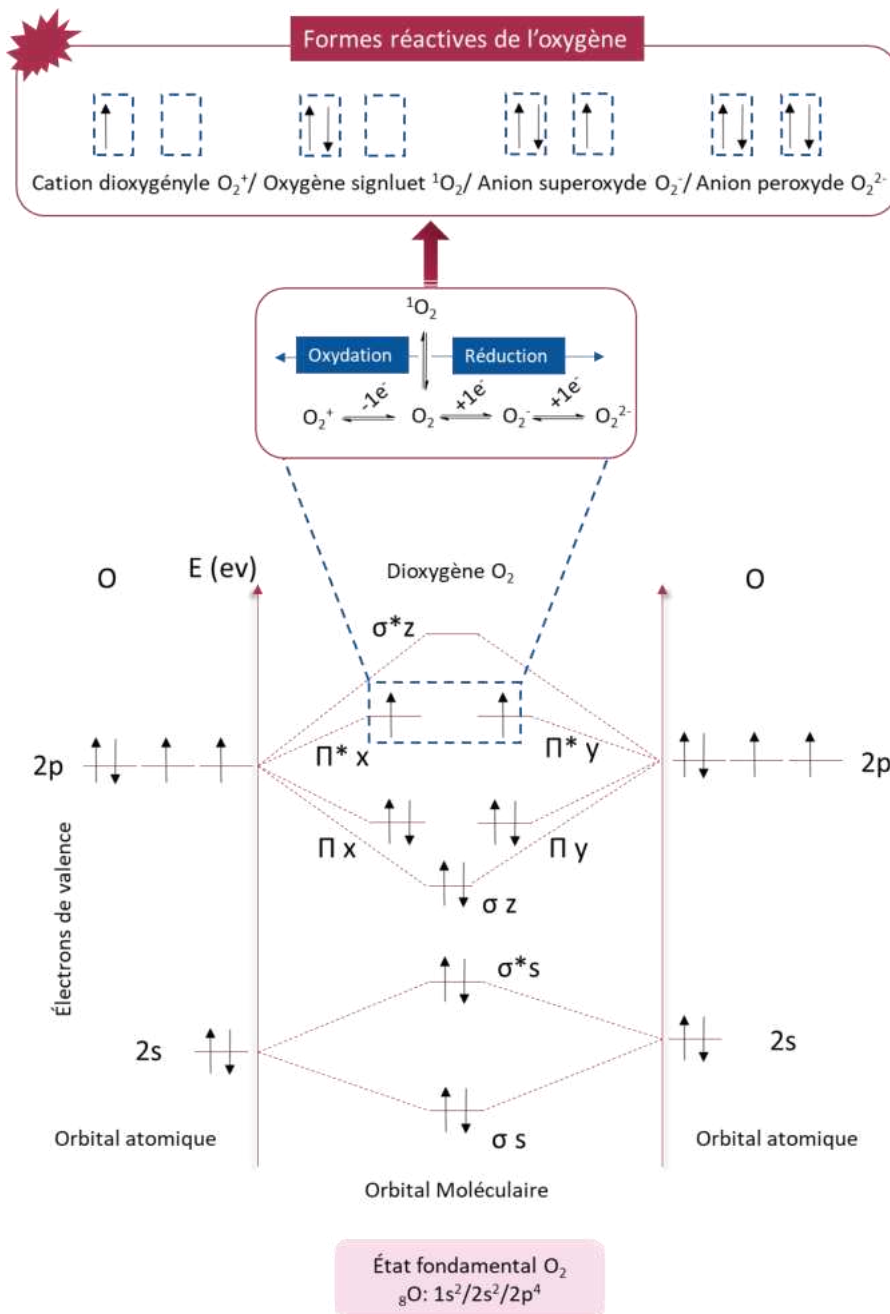


Figure 21 : Diagramme des orbitales moléculaires de la molécule d'oxygène et ses formes réactivées en respectant le principe d'exclusion de Pauli et la règle de Hund. Schématisant les orbitales moléculaires (OM) liantes ( $\sigma$  et  $\pi$ ), antiliantes ( $\sigma^*$  ou  $\pi^*$ ), avec le nombre de paires d'électrons occupant les OM anti-liantes et les OM liantes.

À partir du cholestérol, l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) conduit principalement à la formation du Chol 5 $\alpha$ -OOH, avec une production minoritaire des épimères Chol 6-OOH mentionnés précédemment, sans formation observée des 5,6-ECs (Frimer 1979; Terao 2014). L'étude menée par Leland Smith et ses collègues a montré que l'anion surperoxyde ( $O_2^-$ ) produit chimiquement, photochimiquement ou enzymatiquement, que ce soit dans des milieux anhydres ou aqueux, ne réagit pas avec le cholestérol pour former des produits d'oxydation

déTECTABLES (L. L. Smith, Kulig, et Teng 1977). Cette absence de réactivité est attribuée à son caractère d'agent oxydant négligeable (Kubo et al. 1978). Néanmoins, l' $O_2^-$  peut être indirectement impliqué dans la production d'oxydants plus réactifs dans certaines conditions. C'est ce que montre une étude menée par Lee et ses collègues (J. H. Lee et al. 1997), où les produits d'oxydation du cholestérol ont été détectés uniquement lorsque l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) était en présence du  $H_2O_2$  en milieu aqueux. Les auteurs ont suggéré que ces conditions permettaient d'initier la réaction de dismutation des ions  $O_2^-$  via la réaction de Haber-Weiss, conduisant à la formation possible d'espèces d'oxygène plus réactives telles que le radical hydroxyle ( $HO\cdot$ ) ou l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ). Cette étude révèle la formation des produits d'oxydation en position C7 : les 7-Hydroxy- et 7-Céto -cholestérol (J. H. Lee et al. 1997). La formation du cation dioxygényle ( $O_2^+$ ) requiert un potentiel d'ionisation élevé (+12,1 eV). Bien qu'il soit peu probable que l' $O_2^+$  agisse comme un oxydant dans les systèmes biologiques, il agit principalement comme un accepteur d'électrons. Néanmoins, lorsqu'il est généré en phase gazeuse à partir de l'oxygène, l' $O_2^+$  réagit avec le cholestérol et conduit à la formation des 5,6-ECs ainsi qu'à la formation des 7-Hydroxy- et le 7-Céto-cholestérol sans formation détectable des Chol 7-OOH (Sanche et Van Lier 1976). Cependant, l'énergie d'ionisation appliquée dans l'étude (60 eV) est suffisante et dépasse celle nécessaire pour rompre les liaisons peroxydes (44 kcal/mol = 1.9 eV) (Gardner 1986). De plus, l'étude suggère que l' $O_2^+$  était l'espèce prédominante formée, mais d'autres formes d' $O_2$  métastables étaient également présentes, notamment l'ion  $O^+$ , l'oxygène atomique O, et l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ). Par conséquent, l'identification précise des espèces d'oxygène impliquées et des oxystérols intermédiaires formés durant ces processus d'oxydation du cholestérol demeurent incertaines. L'anion peroxyde ( $O_2^{2-}$ ) induit l'époxydation du cholestérol, entraînant principalement à la formation des 5,6-ECs, dont le 5,6 $\beta$ -EC qui est majoritaire (Smith et Kulig 1976; Smith et al. 1976). L'oxydation du cholestérol par l'ozone ( $O_3$ ) entraîne principalement la production de 5,6-sécostérols comme évoqué précédemment. Par ailleurs, une formation minoritaire des 5,6-ECs a été observée, où le 5,6 $\beta$ -EC prédomine, avec un rapport de 1:8 entre les 5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ -EC (Gumulka, Pyrek, et Smith 1982; Gumulka et Smith 1983). L'oxydation du cholestérol par le radical hydroxyl ( $OH\cdot$ ) résultant de radiolyse de l'eau conduit majoritairement à du 5,6 $\alpha$ -EC avec un ratio entre les 5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ -EC de 3,5:1 ainsi qu'à la formation des 7-Hydroxy- et 7-Céto- cholestérol (Ansari et Smith 1979). Cependant,

l'époxydation du cholestérol dans des dispersions aqueuses de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) conduit à la formation majoritaire du 5,6 $\beta$ -EC avec un ratio entre les 5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ -EC de 1:8 à 1:11 (Smith et Kulig 1976; Gumulka, et al. 1982). Il est essentiel de prendre en compte l'influence des conditions expérimentales sur la nature des produits d'oxydation obtenus. Le pH par exemple, joue un rôle déterminant sur le rapport des 5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ -EC formés lors de l'oxydation. Dans les milieux alcalins, la formation du 5,6 $\beta$ -EC prédomine, alors qu'à un pH 5, le 5,6 $\alpha$ -EC est majoritairement formé. À un pH 3, l'hydrolyse des deux 5,6-ECs empêche leur accumulation parmi les produits d'auto-oxydation, le 5,6 $\beta$ -EC étant plus sensible, est hydrolysée 2,5 fois plus rapidement que l'5,6- $\alpha$ -EC en milieu acide (Maerker et Bunick 1986). Étant donné que l'oxygène atmosphérique agit comme une source d' $O_2$ , l'oxydation du cholestérol qui a vieilli naturellement à l'air a largement été étudié, en raison de sa détérioration observée lors de son stockage. Une auto-oxydation accélérée du cholestérol, mimant celle de l'oxydation naturelle à l'air, est provoquée par un simple chauffage à haute température à l'air (Simic et Karel 1980). Il est montré que des produits similaires se forment dans ces deux cas, la principale différence observée réside dans le taux des produits oxydés formés, l'oxydation naturelle étant nettement plus lente. Durant ce processus, la formation des 5,6-ECs a été observée mais ils sont décrits comme ne résultant pas directement de l'altération thermique du cholestérol, il est postulé que leur formation résulte de la réaction du cholestérol avec les Chol 7-OOH initialement formés avec leurs produits de décomposition thermique (L. L. Smith 1996). Ceci a été décrit dans l'étude menée par Leland Smith. Il a été observé que sous atmosphère inerte  $N_2$ , que ce soit dans des milieux de dispersion aqueuse ou en milieu organique, les Chol 7-OOH ou le Chol 5-OOH induisent efficacement l'époxydation du cholestérol en C5-C6, favorisant ainsi la formation des 5,6-ECs avec un ratio entre les 5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ -EC formé de 1:10. De plus, une corrélation a été établie entre la diminution des taux des hydroperoxycholestérol et l'augmentation des 5,6-ECs. Par ailleurs, l'observation inclut la formation des épimères 7-HC et la déshydrogénation du groupement 3 $\beta$ -OH en C3, conduisant à la formation du 5-Cholesten-3-one, qui subit ensuite un réarrangement en 4-Cholesten-3-one (Smith 1996; 1987; Simic et Karel 1980). Dans la littérature, différents ratios ont été également rapportés pour la formation des 5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ -EC. Un ratio 1:1 a été observé pour le cholestérol vieilli naturellement à l'air (Gumulka, Pyrek, et Smith 1982), tandis qu'un ratio de 1:3,6 a été observé pour le cholestérol radio-marqué [ $^{14}C$ ] oxydé naturellement

(Aringer et Eneroth 1974). L'hydratation des 5,6-ECs en milieu acide conduit à la formation du cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT), identifié en 1908 à partir du cholestérol (Pickard et Yates 1908). Une déshydrogénation supplémentaire par voie enzymatique du CT au niveau de la fonction alcool en position C6 (Smith et al. 1967a; Schwenk et al. 1952) conduit à l'OCDO (Voisin et al. 2017) (Figure 22) et Tableau 2.

### III. Formation par voie non-enzymatique des hydroperoxydes de cholestérol sur la chaîne latérale

L'auto-oxydation du cholestérol par abstraction d'hydrogène et la formation d'hydroperoxyde de cholestérol ne se limite pas qu'aux carbones allyliques, mais peut également se produire sur la chaîne latérale (Johan E. Van Lier et Smith 1970). Sur le plan énergétique, l'abstraction d'un atome d'hydrogène est davantage privilégiée au niveau des carbones tertiaires C-17, C-20 et C-25 (14,76 kcal/mol) que sur les carbones secondaires C22, C23 et C24 (17,01 kcal/mol), qui sont eux-mêmes plus réactifs que les carbones primaires C21 et C26 (19,83 kcal/mol) (Guo et al. 2023). Cette sélectivité s'observe dans les rendements d'hydroperoxyde de cholestérol formés sur la chaîne latérale, isolés à partir du cholestérol vieilli naturellement à l'air, avec le cholestérol 25-hydroperoxyde (Chol 25-OOH) comme produit majoritaire suivis des épimères cholestérol 20-hydroperoxyde (Chol 20-OOH) comme produit minoritaire (Van Lier et Rousseau 1976; Van Lier et Smith 1970). Ces composés peuvent subir une dégradation supplémentaire pour former respectivement le 25-HC (Fieser, Huang, et Bhattacharyya 1957) et les 20-Hydroxycholestérol (20HC) (J.E. Van Lier et Rousseau 1976; Vanlier et Smith 1970) . Le cholestérol 24-hydroperoxyde (Chol 24-OOH) (L. L. Smith et Van Lier 1971) et le cholestérol 27-hydroperoxyde (Chol 27-OOH) (Johan E. Van Lier et Kan 1972) sont deux autres dérivés qui peuvent se former lorsque le cholestérol est exposé à de fortes conditions d'oxydation. Leur dégradation conduit respectivement aux 24-Céto-cholestérol (24-KC) et 27-Hydroxycholestérol (27-HC) (L. L. Smith 1987) (Figure 22) et Tableau 2

Tableau 2: Répartition majoritaire des oxystérols selon les espèces oxydantes impliquées.

Position d'attaque	Oxystérols formés	Espèces oxydantes							Références
		$^3\text{O}_2$	$\text{O}_2^+$	$^1\text{O}_2$	$\text{O}_2^-$	$\text{O}_2^{2-}$	$\text{O}_3$	$\cdot\text{OH}$	
C3	Dérivés 3-oxo	+	-	-	-	-	-	-	L. L. Smith 1996
C5-C6	5-hydroperoxyde	-	-	+	-	-	-	-	Frimer 1979 Terao 2014
	EC	$\beta>\alpha$	+	-	-	$\beta>\alpha$	$\beta>\alpha$	$\beta>\alpha$	L. L. Smith, Kulig, et Teng 1977 Sanche et Van Lier 1976 Smith et al. 1976 Smith et al. 1978 Gumulka, Pyrek, et Smith 1982 Gumulka et Smith 1983 Ansari et Smith 1979 Smith, Kulig, Martin 1976
	CT	+	-	-	-	-	+	+	Leland Smith et al. 1967 Pickard et Yates 1908
	OCDO	-	-	-	-	-	-	-	Leland Smith et al. 1967
	5,6-secostérol	-	-	+	-	-	+	-	Gumulka, Pyrek, et Smith 1982 Gumulka et Smith 1983
C7	7-hydroperoxydes	+	-	-	-	-	-	+	L. L. Smith 1996
	7-hydroxydes	+	+	-	-	-	-	+	Lee et al. 1997 Sanche et Van Lier 1976 Ansari et Smith 1979
	7-céto	+	+	-	-	-	-	+	Lee et al. 1997 Sanche et Van Lier 1976 Ansari et Smith 1979
Chaîne latérale	Divers hydroperoxydes	+	-	-	-	-	-	-	L. L. Smith 1981

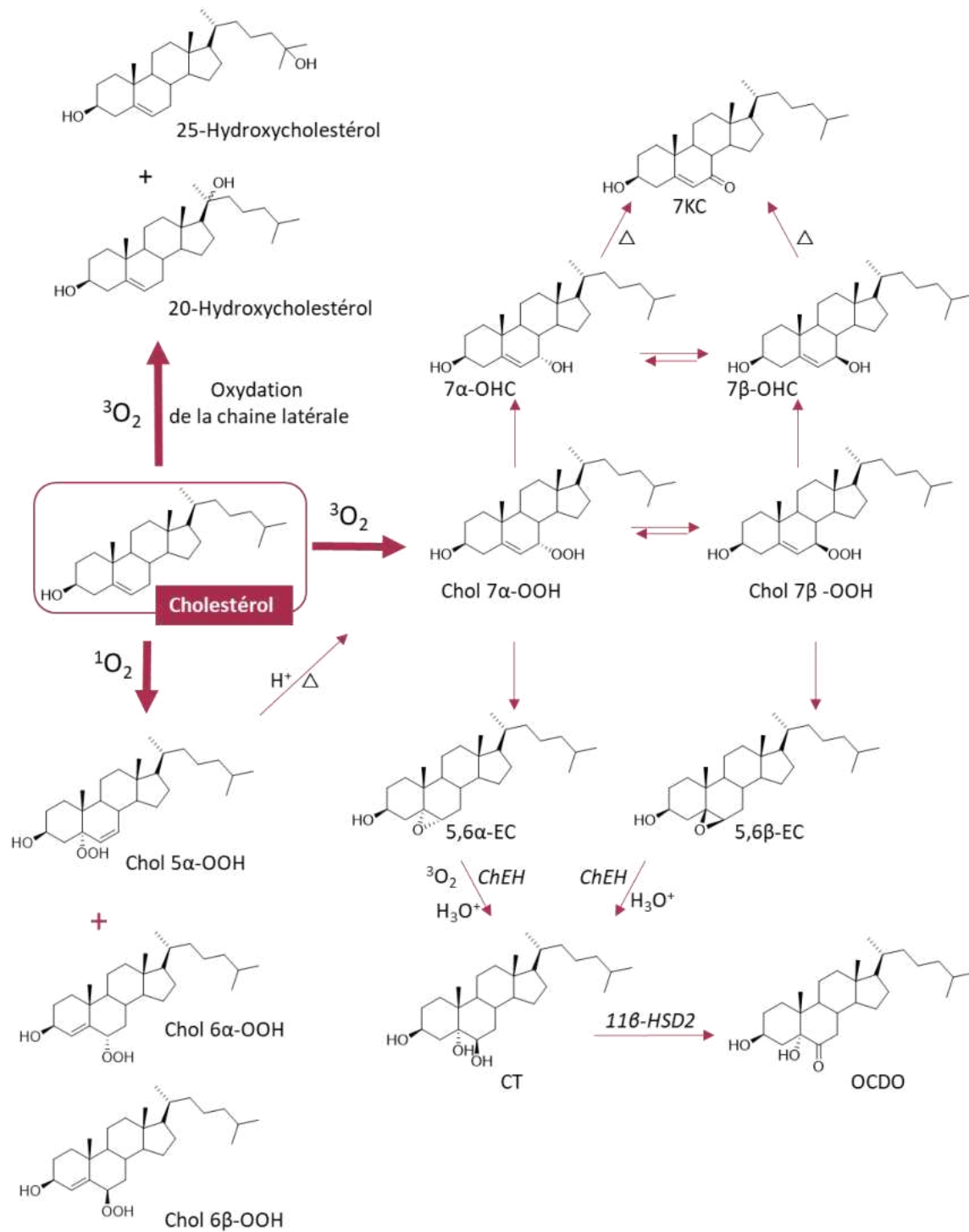


Figure 22 : Schéma général menant à certains oxystérols par auto-oxydation du cholestérol et la transformation des 5,6-ECs par voie enzymatique en CT et OCDO.



### 2.2.2. Formation des oxystérols par voie enzymatique

Dans des conditions physiologiques, la synthèse des oxystérols à partir du cholestérol est majoritairement médiée par des réactions enzymatiques [Russel 2003], bien qu'ils puissent aussi être générés par des mécanismes non-enzymatiques (voir section 2.2.1). Dans cette voie de transformation enzymatique, les principales enzymes impliquées dans l'introduction de groupement hydroxyle sur le cholestérol appartiennent à la superfamille des cytochromes P450 (CYP450). La position et la stéréochimie des hydroxyles rajoutés sont cruciales pour leur activité biologique (Janowski et al. 1996). Cependant, il existe une exception, celle de la cholestérol 25-hydroxylase (CH25H) (E. G. Lund et al. 1998). À la différence aux autres enzymes de cette voie, la CH25H ne fait pas partie de la superfamille des CYP450. Elles diffèrent considérablement en termes de structure et de mécanisme d'oxydation mais toutes les deux nécessitent la présence d'un cofacteur métallique dans leur site actif pour exploiter le pouvoir oxydant du dioxygène moléculaire ( $O_2$ ) afin de rompre la liaison alcane (C-H, 98 kcal/mol) (Gardner 1986) et initier l'hydroxylation (C-OH) (Shanklin et Cahoon 1998). Nous allons voir ci-dessous le processus catalytique de chacune de ces enzymes.

Les CYP450 responsables de l'hydroxylation du cholestérol appartiennent à la famille des hémoprotéines qui contiennent environ 500 acides aminés chacun. Ils sont appelés P450 en référence au pigment 450, car ils absorbent toute la lumière à 450 nm dans leurs états réduits complexés avec le monoxyde de carbone (CO) (Miller et Auchus 2011). Au cœur du site actif du CYP450 se trouve une partie héminique de structure tétrapyrrolique (porphyrine) portant un atome de fer en son centre formant l'hème (Figure 23). Cet atome de fer est essentiel pour la fixation et l'activation de l'oxygène moléculaire. Il est coordonné à quatre atomes d'azote qui font partie de la structure tétrapyrrolique jointe sur les carbones  $\alpha$  par quatre ponts méthine. Le cinquième ligand est un anion thiolate fourni par un résidu de cystéine de la protéine. La sixième position de coordination peut être occupée par divers ligands. En l'absence de substrat, cette position est souvent occupée par une molécule d'eau. Lors de la catalyse, elle peut être remplacée par une molécule de dioxygène ( $O_2$ ) ou, de manière compétitive, par une molécule de CO (T. D. Porter et Coon 1991).

Pour accomplir sa fonction, le CYP450 requiert deux cofacteurs protéiques : 1) l'adrenodoxine réductase, une enzyme contenant du FAD (flavine adénine dinucléotide) qui utilise le NADPH

comme donneur d'électrons et 2) l'adrenodoxine, une protéine à fer-soufre qui reçoit et transfère les électrons nécessaires à l'activité catalytique du CYP450 (T. D. Porter et Coon 1991). Le bilan global de l'insertion d'un atome d'oxygène au niveau de la liaison C-H du cholestérol s'écrit selon la réaction suivante : Cholestérol + NADPH + H<sup>+</sup> + O<sub>2</sub> = Hydroxycholestérol + NADP<sup>+</sup> + H<sub>2</sub>O.

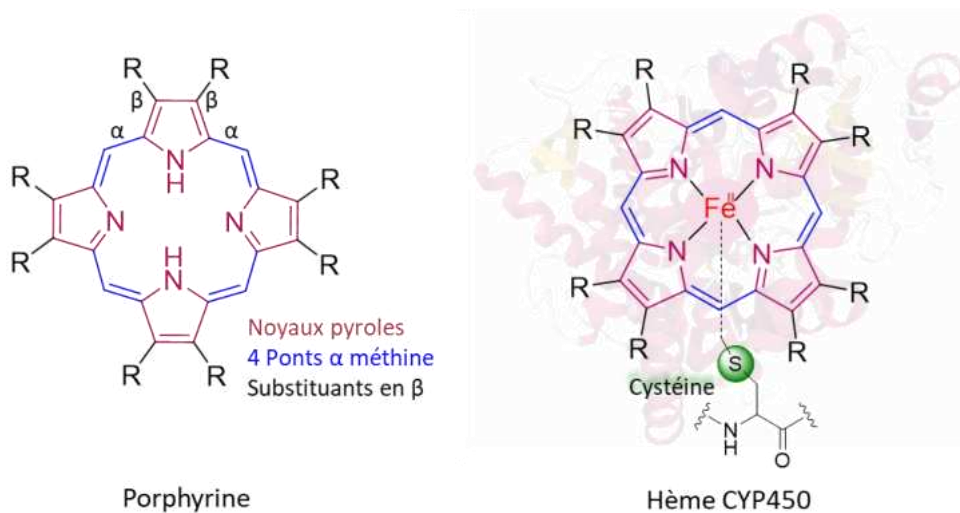


Figure 23: Structure de la porphyrine et de l'hème Fe<sup>II</sup> CYP450

Les étapes ci-dessous ainsi que la (Figure 24) illustrent le processus catalytique par lequel le CYP450 hydroxyle le cholestérol (T. D. Porter et Coon 1991) :

1. **Liaison du cholestérol** : Le cholestérol se lie au site actif de l'enzyme CYP450 dont le fer hémique est sous la forme ferrique (Fe<sup>III</sup>), entraînant la rupture de la liaison Fe-H<sub>2</sub>O.
2. **Réduction de l'hème** : le CYP450 réductase transfère un électron du NADPH au groupe hème du CYP450, réduisant le Fe<sup>III</sup> en fer ferreux (Fe<sup>II</sup>). Cette étape est nécessaire puisque c'est le Fe<sup>II</sup> qui a une affinité pour l'O<sub>2</sub>.
3. **Liaison de l'oxygène** : le Fe<sup>II</sup> lie une molécule O<sub>2</sub> sur le sixième site de coordination du fer hémique, formant un complexe oxygéné.
4. **Deuxième réduction** : un deuxième électron est transféré du NADPH via l'adrenodoxine, passant d'un complexe Fe<sup>III</sup> O<sub>2</sub><sup>-</sup> au complexe Fe<sup>III</sup> O<sub>2</sub><sup>2-</sup>.
5. **Protonation** : une première protonation se produit, nécessaire à la libération d'H<sub>2</sub>O de l'étape suivante

6. **Formation du complexe réactif** : deuxième protonation et un clivage hétérolytique de la molécule d'oxygène produisent une molécule d'eau ( $H_2O$ ) et un atome d'oxygène actif sous la forme d'intermédiaire oxo-ferryl ( $Fe(IV)=O$ ).
7. **Transfert d'hydrogène** : l'atome d'oxygène réactif facilite le transfert d'un atome d'hydrogène depuis la liaison C-H du cholestérol au complexe, générant l'espèce  $Fe(IV)-OH$  et le radical cholestérol. La force motrice de cette étape est la rupture d'une liaison C-H pour former une liaison O-H, thermodynamiquement plus favorable.
8. **Hydroxylation** : l'atome d'oxygène est transféré vers le carbone radicalaire pour oxyder le cholestérol, générant l'hydroxycholestérol.
9. **Libération du produit** : l'hydroxycholestérol, ayant perdu son affinité pour le  $Fe^{III}$  en raison de son oxydation, est libéré du site actif de l'enzyme. Le CYP450 retourne alors à son état de repos, prêt pour un nouveau cycle catalytique.

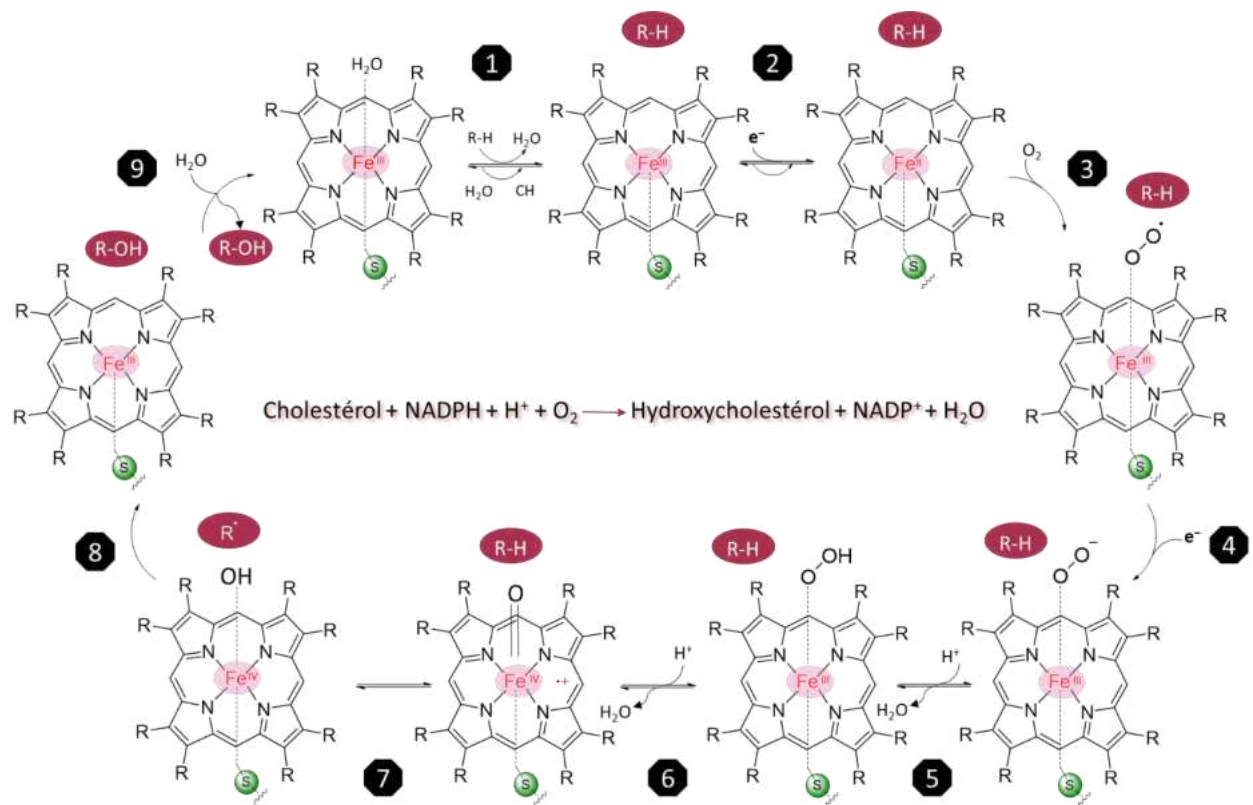


Figure 24: Mécanisme général de l'hydroxylation du cholestérol catalysée par le CYP450, R-H = cholestérol

À la différence du CYP450, la CH25H est une enzyme de 31,6 kDa appartenant à une famille d'enzymes non-hémique associée au réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi (E. G. Lund et al. 1998).. L'enzyme utilise l'oxygène moléculaire et le cholestérol comme substrat et

un cofacteur ferreux  $\text{Fe}^{\text{II}}$  sous la configuration  $\text{Fe}-\text{O}-\text{Fe}$  ou  $\text{Fe}-\text{OH}-\text{Fe}$ . Ces cofacteurs sont liés à l'enzyme par des interactions impliquant la chaîne latérale N-imidazole des résidus d'histidine essentiels pour son activité catalytique (E. G. Lund et al. 1998). Le mécanisme d'hydroxylation du cholestérol par la CH25H est illustré dans la (Figure 25), par analogie au mécanisme proposé par Shanklin et Cahoon (Shanklin et Cahoon 1998). La catalyse est initiée par la liaison spécifique du cholestérol au niveau du site actif de la CH25H. Dans sa forme initiale l'enzyme présente un centre di-ferrique dans un état oxydé ( $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{Fe}^{\text{III}}$ ). L'activation de celui-ci est initiée par  $2e^-$  fournis par le NADPH qui le conduit à sa forme réduite (diferreux  $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{Fe}^{\text{II}}$ ). Après réduction, la fixation d'un atome d'oxygène forme un pont peroxy qui par rupture de la liaison O-O conduit à l'intermédiaire à quatre centres, intermédiaire oxydant clé responsable de l'abstraction d'hydrogène et de l'incorporation de l'atome d'oxygène en position C25 du cholestérol de manière régiosélective et contrôlée au niveau de l'enzyme (Shanklin et Cahoon 1998), menant à la formation du 25-HC. Le 25-HC formé est libéré de l'enzyme, prêt à être utilisé dans d'autres voies métaboliques ou à exercer ses fonctions biologiques spécifiques.

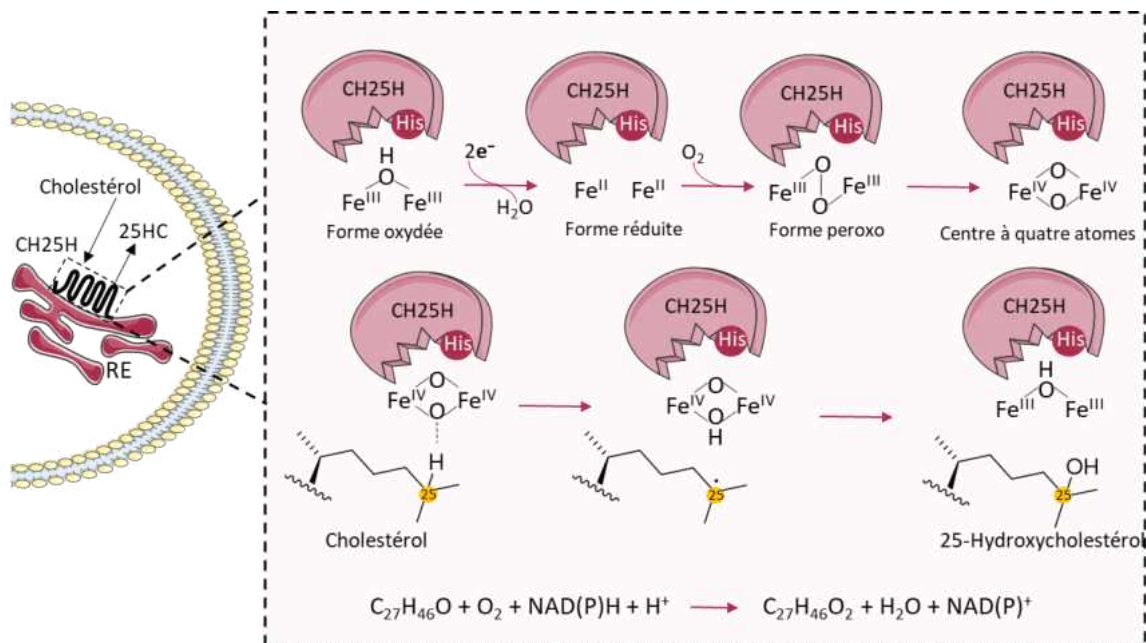


Figure 25: Proposition de mécanismes réactionnels pour la CH25H : Activation de l'oxygène et hydroxylation du cholestérol en 25-hydroxycholestérol, adapté depuis (Shanklin et Cahoon, 1998)

### 2.2.2.1. Hydroxylation enzymatique sur la chaîne latérale

L'hydroxylation enzymatique de la chaîne latérale du cholestérol peut conduire à la formation du 22(R)-, 20(S)-, 24(S)-, 25- et 27- Hydroxycholestérols. Une attention particulière sera portée aux 25- et au 27- Hydroxycholestérols pour la suite, afin de faciliter la compréhension des travaux de cette thèse.

- I. *Le 22(R)-Hydroxycholestérol (22R-HC)* : le cholest-5-en-3 $\beta$ ,22R-diol (22R-HC) est généré à partir du cholestérol par l'action de la cholestérol 22-hydroxylase, un CYP450 (CYP11A1) (Hanukoglu 1992), également connu sous le nom de cytochrome CYP450<sub>sc</sub>. Cette enzyme est localisée dans la membrane mitochondriale interne (Miller 2013) et est largement exprimée dans les glandes surrénales. Elle est également présente dans les ovaires, les testicules et le placenta, où elle joue un rôle essentiel dans la biosynthèse des hormones stéroïdes (Shih et al. 2011), (Figure 26). En effet, le CYP11A1 peut ensuite convertir le 22R-HC en 20R,22R-diHydroxycholestérol (20R,22R-diHC) (Hanukoglu 1992) et ultimement converti en pregnénolone, un précurseur crucial dans la synthèse de diverses hormones stéroïdes ( Hanukoglu 1992, Griffiths et Wang 2020) (voir section 1.4).

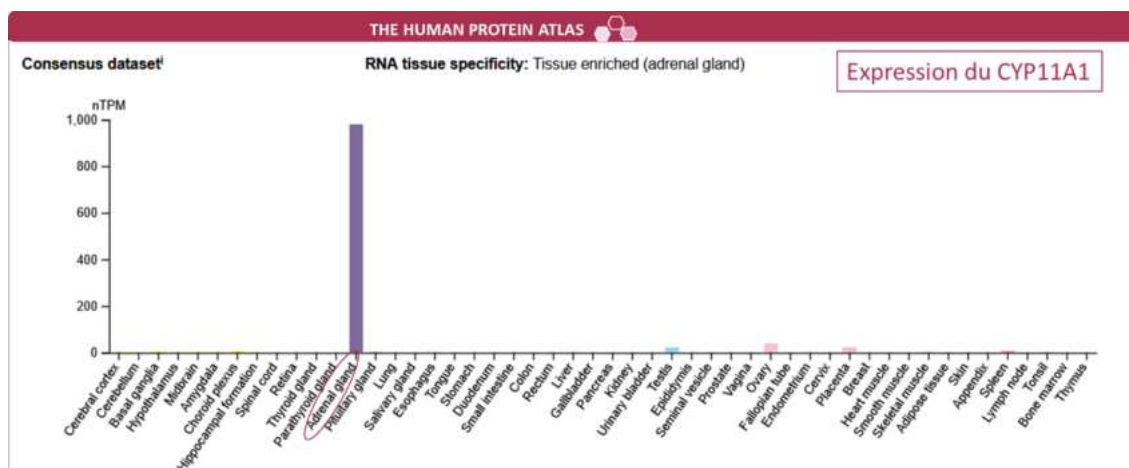


Figure 26 : Les niveaux d'expression en mRNA du CYP11A1 dans divers organes. Ces données proviennent du site web « [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org) » « The Human Protein Atlas. La valeur d'expression est normalisée et représentée par nTPM (transcripts per million) est calculée comme la valeur maximale de nTPM pour chaque gène.

- II. *Le 20(S)-Hydroxycholestérol (20S-HC)*: le cholest-5-ene-3 $\beta$ ,20S-diol (20S-HC) est un oxystérol (Figure 34), dont l'identification reste encore mal documentée. Mais des études menées par différents groupes ont mis en évidence sa présence dans divers tissus et

fluides biologiques, notamment dans des extraits de surrénales bovines (Roberts et al. 1969) et le cerveau de souris (Lin et al. 2003; Yutuc et al. 2020), ainsi que le dans des fluides biologiques de placenta humain (Lin et al. 2003; Yutuc et al. 2020). Il est suggéré que le CYP11A1 peut également catalyser la formation du 20S-HC à partir du cholestérol (Morisaki et al. 1985) (voir la base de donnée [KEGG](#)). Cependant l'étude de cristallographie menée par Strushkevich et ses collègues (Strushkevich et al. 2011) a montré que les complexes enzyme-substrat obtenus du CYP11A1 en présence du 22R-HC (référence PDB: [3N9Z](#)) ou du 20S-HC (référence PDB: [3NA1](#)) révèlent une meilleure interaction du 22-RHC avec les acides aminés du site actif. De plus, la distance entre l'hydroxyle en position C22 et l'hème est de 2.6 Å contre 3.7 Å pour celui en position C20. Cela contribue à une meilleure stabilité et à une plus forte liaison du 22R-HC au site actif par rapport au 20S-HC pour la prochaine étape d'hydroxylation. Cela est en accord avec ce qui a été proposé par Lin et al (Lin et al. 2003), que le 20S-HC est produit à partir du cholestérol par l'action d'une monooxygénase spécifique, la 20(S)-hydroxylase, qui insère l'atome d'oxygène entre le C20 et son hydrogène tertiaire, qui est une enzyme qui reste à identifier. Cet oxystérol a suscité un intérêt biologique car il a été identifié comme un ligand allostérique de l'oncoprotéine Smoothed (Smo), une protéine réceptrice clé dans la voie de signalisation du hedgehog (Hh), qui joue un rôle crucial dans le développement embryonnaire, la régénération tissulaire et d'autres processus biologiques (Kha et al. 2004; Nachtergaele et al. 2012; Nedelcu et al. 2013).

- III. *24(S)-Hydroxycholestérol (24(S)-HC)* : le système nerveux central (CNS) est l'organe le plus riche en cholestérol, représentant environ 20 % du cholestérol total de l'organisme avec une teneur de 15 mg/g de tissus (Dietschy et Turley 2004). Dans le CNS, le cholestérol est synthétisé *in situ* à partir de l'acétate dû à l'imperméabilité barrière hémato-encéphalique (BHE) au cholestérol extérieur (D. W. Russell et al. 2009). Afin de préserver l'homéostasie, l'excès de cholestérol est principalement transformé en métabolite plus soluble pouvant franchir la BHE, le 5-Cholesten-3 $\beta$ ,24(S)-diol (24S-HC) appelé également cérébrostérol (Ercoli et Ruggieri 1953) (Figure 34). En effet, contrairement au cholestérol, l'ajout du groupement hydroxyle en position C24 permet une interaction beaucoup plus favorable avec les phospholipides membranaires. Cela induit une réorganisation de la chaîne latérale des phospholipides (Figure 27), créant ainsi un canal par lequel le 24S-HC



peut transiter jusqu'au feuillet opposé, facilitant ainsi son transport par les lipoprotéines. Le flux à travers la membrane est déterminé par le gradient de la concentration du 24S-HC (Björkhem et Meaney 2004).

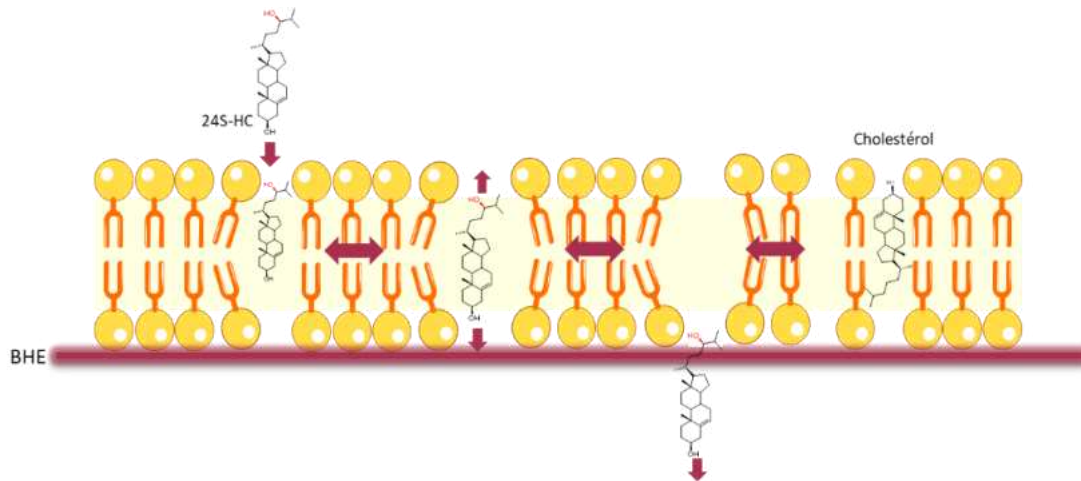


Figure 27: Modélisation du passage du 24S-Hydroxycholestérol (24S-HC) à travers une membrane de la BHE.

Le 24S-HC est généré à partir du cholestérol par la cholestérol 24S-hydroxylase (CYP46A1), un CYP450 présent dans le réticulum endoplasmique et largement exprimée dans le CNS (E. G. Lund, Guileyardo, et Russell 1998) (Figure 28). La formation du 24S-HC permettrait d'éviter l'accumulation de cholestérol dans le cerveau, accumulation qui a été associée à des maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer (Heverin et al. 2004). Le 24S-HC ainsi relégué et retrouvé dans la circulation générale (39ng/ml (0.1μM) - 91ng/ml (0.23μM) (Burkard et al.2004) provient principalement du cerveau, présentant environ 80 % du 24HC circulant (Björkhem et al. 1998). Le foie est le principal site de biotransformation ultérieure du 24S-HC, intégré dans la biosynthèse des acides biliaires. Des études ont montré que les niveaux du 24S-HC dépendent du vieillissement, avec des taux cinq fois plus élevés chez les jeunes que chez les adultes (Lütjohann et al. 1996).

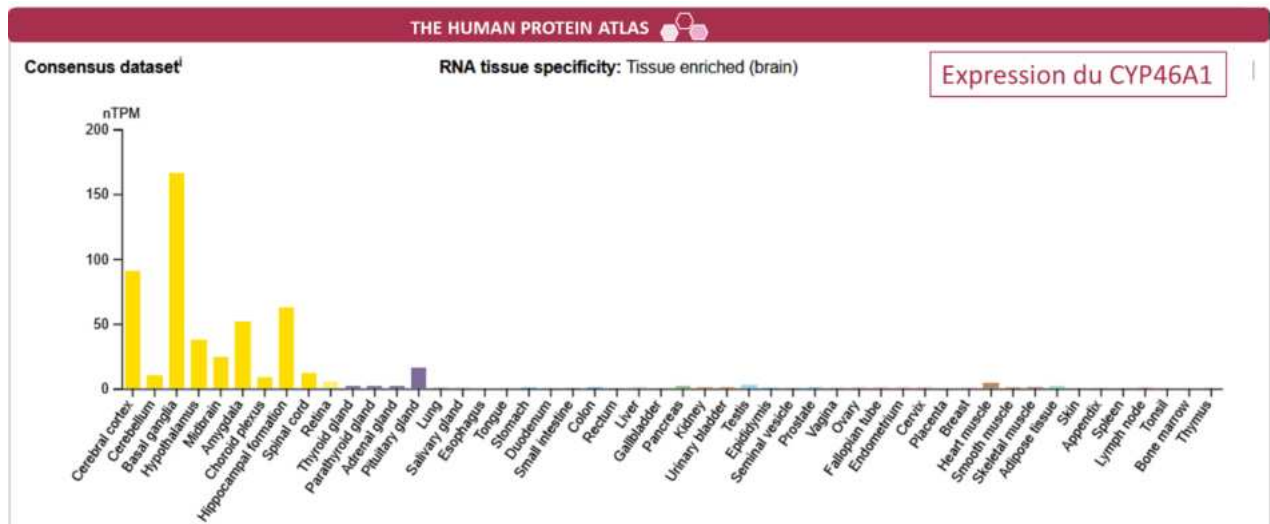


Figure 28 : Les niveaux d'expression en mRNA du CYP46A1 dans divers organes. Ces données proviennent du site web « [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org) » « The Human Protein Atlas. La valeur d'expression est normalisée et représentée par nTPM (transcripts per million) est calculée comme la valeur maximale de nTPM pour chaque gène.

- IV. **25-Hydroxycholestérol (25-HC) :** Le cholest-5-èn-3 $\beta$ ,25-diol (25-Hydroxycholestérol) (25-HC) est un oxystérol caractérisé par la présence d'un groupe hydroxyle en position C25 sur la chaîne isooctyle du cholestérol, en plus du groupe hydroxyle en position C3 (D. Russell 2000). Il peut être généré à partir du cholestérol à la fois par voie enzymatique (Björkhem et Gustafsson 1974) et non-enzymatique (Fieser, Huang, et Bhattacharyya 1957). Cependant, l'oxydation *in vitro* des lipoprotéines génère une faible quantité de 25-HC (0,5  $\mu$ g/ml) par rapport aux autres oxystérols produits par voie non-enzymatique, tels que le 7 $\alpha$ -HC (17.5  $\mu$ g/ml), le 7 $\beta$ -HC (26,1  $\mu$ g/ml) et le 7-KC (25  $\mu$ g/ml) (Susanna Dzeletovic et al. 1995). Ce qui implique que l'oxydation des lipoprotéines ne semble pas contribuer de manière significative à la production du 25-HC endogène (Susanna Dzeletovic et al. 1995). Dans le plasma, la concentration du 25-HC en conditions normales se situe généralement entre 2 et 6 ng/ml (Dzeletovic et al 1995) , ce qui est relativement faible comparé aux autres oxystérols hydroxylés sur la chaîne latérale, comme le (24HC) (64 ng/ml) et le 27-Hydroxycholestérol (27-HC) (154 ng/ml). La biosynthèse du 25-HC est principalement catalysée par une hydroxylase spécifique, la cholestérol 25-hydroxylase (CH25H) (E. G. Lund et al. 1998).

En plus de la CH25H, certaines enzymes appartenant à la famille des cytochromes P450, telles que la cholestérol 27-hydroxylase (CYP27A1) (Erik Lund et al. 1993), le CYP46A1 (Lund et al. 1998) et le cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) (Honda et al. 2011), ont la capacité d'hydroxyler



le cholestérol en position C25 produisant du 25-HC comme réaction secondaire à leur fonction principale (Figure 29).

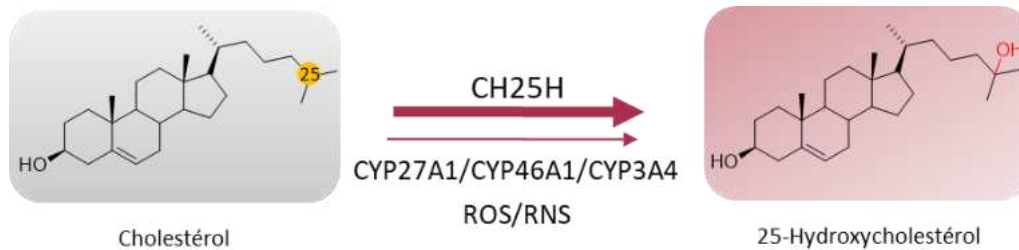


Figure 29 : Voies de biosynthèse possibles conduisant à la formation du 25-Hydroxycholestérol

Dans les conditions physiologiques normales, l'expression de la cholestérol 25-hydroxylase dans les tissus est généralement faible. Chez la souris, cette expression est notablement plus élevée dans les poumons, le cœur et les reins, tandis qu'elle est maintenue à un niveau faible et stable dans divers organes humains (E. G. Lund et al. 1998). Selon la base de données « The Human Protein Atlas », la CH25H est présente dans divers organes, mais elle est principalement exprimée au niveau du thymus, des tissus adipeux, de la vessie, des poumons, de la vésicule biliaire, ainsi que dans le CNS (Figure 30).

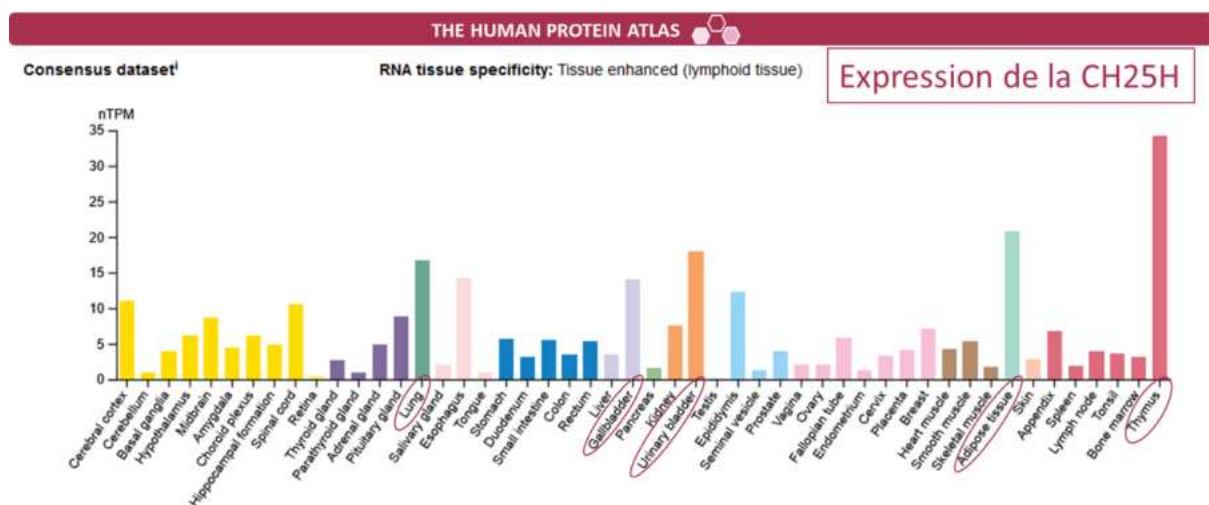


Figure 30 : Les niveaux d'expression en mRNA de la CH25H dans divers organes. Ces données proviennent du site web « [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org) » « The Human Protein Atlas ». La valeur d'expression est normalisée et représentée par nTPM (transcripts per million) est calculée comme la valeur maximale de nTPM pour chaque gène.

- V. **27-Hydroxycholestérol (27-HC):** Le (25R)-26-Hydroxycholestérol (27-HC) est un oxystérol caractérisé par la présence d'un groupe hydroxyle en position C27 sur la chaîne isooctyle du cholestérol, en plus du groupe hydroxyle en position C3 (Figure 31) produit exclusivement par voie enzymatique à partir du cholestérol via la cholestérol 27-

hydroxylase (Cali et Russell 1991), une enzyme mitochondriale appartenant à la famille des cytochromes P450 (CYP27A1) avec un poids moléculaire de 60 kDa (Sato et al. 1977). Cette enzyme est largement exprimée dans le foie mais son ARN messager (ARNm) a également été trouvé dans de nombreux tissus non-hépatiques, tels que le cerveau, le duodénum, les glandes surrénales et les poumons (Cali et Russell 1991), et au niveau des macrophages (Babiker et al. 1997) (Figure 32). Cela suggère que la concentration du 27-HC peut être régulée et qu'il peut être produit localement dans les tissus extra-hépatiques. Le 27-HC se distingue des autres oxystérols comme l'oxystérol le plus abondant retrouvé dans la circulation sanguine, avec une corrélation positive avec le cholestérol circulant (Hirayama et al. 2009). Différentes études utilisant diverses techniques d'analyse, ont rapporté des concentrations plasmatiques de 27-HC allant de 120 ng/ml (Burkard et al. 2004), 130 ng/ml (N.B. Javitt et al. 1981) à 154 ng/ml (Dzeletovic et al 1995) et 159 ng/ml (Babiker et Diczfalusy 1998). Le 27-HC est ensuite transporté dans le foie, où il joue un rôle crucial en tant que précurseur dans la biosynthèse des acides biliaires, avec la cholestérol 7- $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1) et la CYP27A1 comme enzymes clés (Russell 2009). L'importance de cette voie dans le métabolisme du cholestérol est illustrée par le fait que des mutations du gène *CYP27A1* entraînent une déficience ou une absence de l'activité enzymatique du CYP27A1 (Cali et al. 1991). Cette déficience bloque la conversion du cholestérol en 27-HC, perturbant ainsi la biosynthèse des acides biliaires (Setoguchi et al. 1974). En conséquence, le cholestérol et sa forme 5 $\alpha$ -réduite, le cholestanol, s'accumulent dans divers tissus, causant les symptômes cliniques caractéristiques de la maladie xanthomatose cérébro-tendineuse (XCT; OMIM#213700) (Menkes 1968), une maladie génétique rare décrite pour la première fois en 1937 par Bogaert et ses collègues. XCT est caractérisée par la formation de xanthomes, ou dépôts lipidiques, dans divers tissus en particulier au niveau cérébral, oculaire, cutané et tendineux. Conduisant à des complications neurologiques, à la cataracte, à l'athérosclérose prématurée (Nie et al. 2014). Au fil des études, plusieurs marqueurs ont été identifiés dans cette maladie.

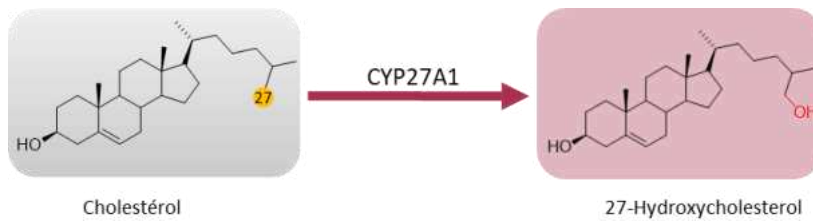


Figure 31 : Voie de biosynthèse conduisant à la formation du 27-Hydroxycholestérol.

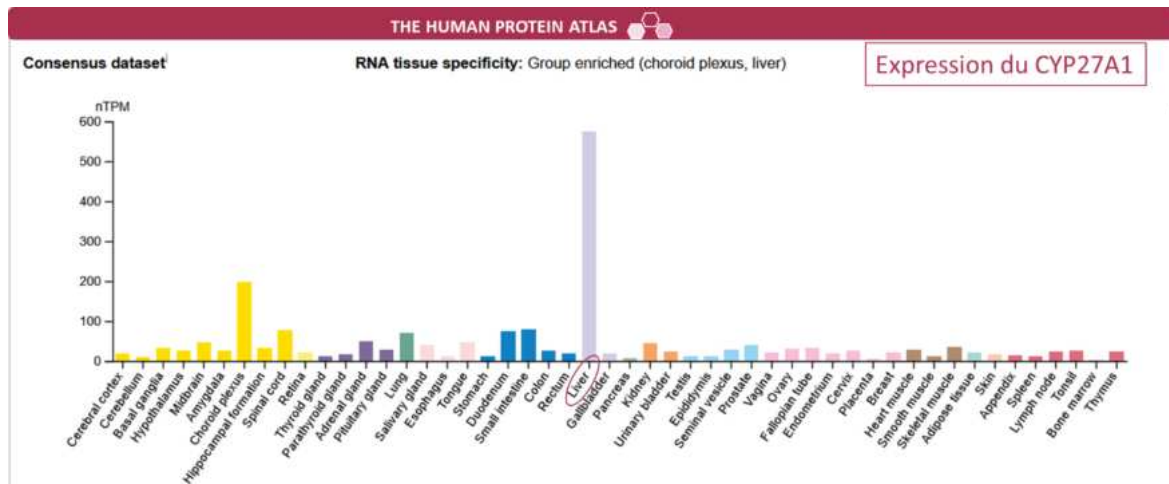


Figure 32 : Les niveaux d'expression en mRNA du CYP27A1 dans divers organes. Ces données proviennent du site web « [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org) » « The Human Protein Atlas. La valeur d'expression est normalisée et représentée par nTPM (transcripts per million) est calculée comme la valeur maximale de nTPM pour chaque gène.

Un débat existe toujours autour de la nomenclature du 27-HC, les revues de Norman B. Javitt ont longuement discuté ce point (N. Javitt 1990; Norman B. Javitt 2002; Fakheri et Javitt 2012). Cependant, les règles de l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) sont claires. Les recommandations de l'IUPAC ne font pas de distinction entre les groupes méthyles terminaux de la chaîne latérale, C26 et C27, sauf s'ils sont substitués, comme par une hydroxylation, où le carbone substitué devient alors C26 (Goad et Akihisa 1997). L'hydroxylation stéréospécifique de l'un des deux groupements méthyles énantiotopiques provoque l'asymétrie du carbone C-25, qui devient alors un centre prochiral (Norman B. Javitt 2002). En 1977, Popjak (Popjak et al. 1977) propose que le méthyl pro-R, qui provient en réalité du C2 de l'acide mévalonique, soit numéroté C26, et que le méthyl pro-S, qui provient du C6 de l'acide mévalonique, soit numéroté C27 (Figure 33). Conduisant respectivement par changement d'ordre de priorité des groupements rattachés au C25 après hydroxylation aux deux stéréoisomères : le (25S)-26-Hydroxycholestérol et le (25R)-26-Hydroxycholestérol

(Popjak et al. 1977). La présence de ces deux stéréoisomères a été détectée dans le cholestérol vieilli naturellement à l'air. La formation du Chol 27-OOH (Johan E. Van Lier et Kan 1972) suivie de la scission homolytique de la liaison oxygène-oxygène du peroxyde et de la protonation du radical RO• intermédiaire (L. L. Smith 1987) conduit à une production approximativement égale des épimères (25S)-26-Hydroxycholestérol et (25R)-26-Hydroxycholestérol, avec un ratio de 60:40 (Redel 1979). Cependant, le 27-Hydroxycholestérol présent *in vivo* a une origine enzymatique (Fredrickson et Ono 1956; N.B. Javitt et al. 1981), indiquant qu'un seul des deux groupes méthyles terminaux du cholestérol est hydroxylé (Berseus 1966; Atsuta et Okuda 1981). Étant donné que ce groupe provient du C6 du mévalonate, il est nommé groupement méthyle C27 (Popjak et al. 1977). De plus, la désignation du gène codant pour l'enzyme qui catalyse son oxydation par le CYP27A1 (Andersson et al. 1989; Cali et Russell 1991), a facilité l'utilisation courante du terme 27-Hydroxycholestérol (27-HC) pour se référer au (25R)-26-Hydroxycholestérol. Un terme que nous adopterons par la suite dans cette thèse.

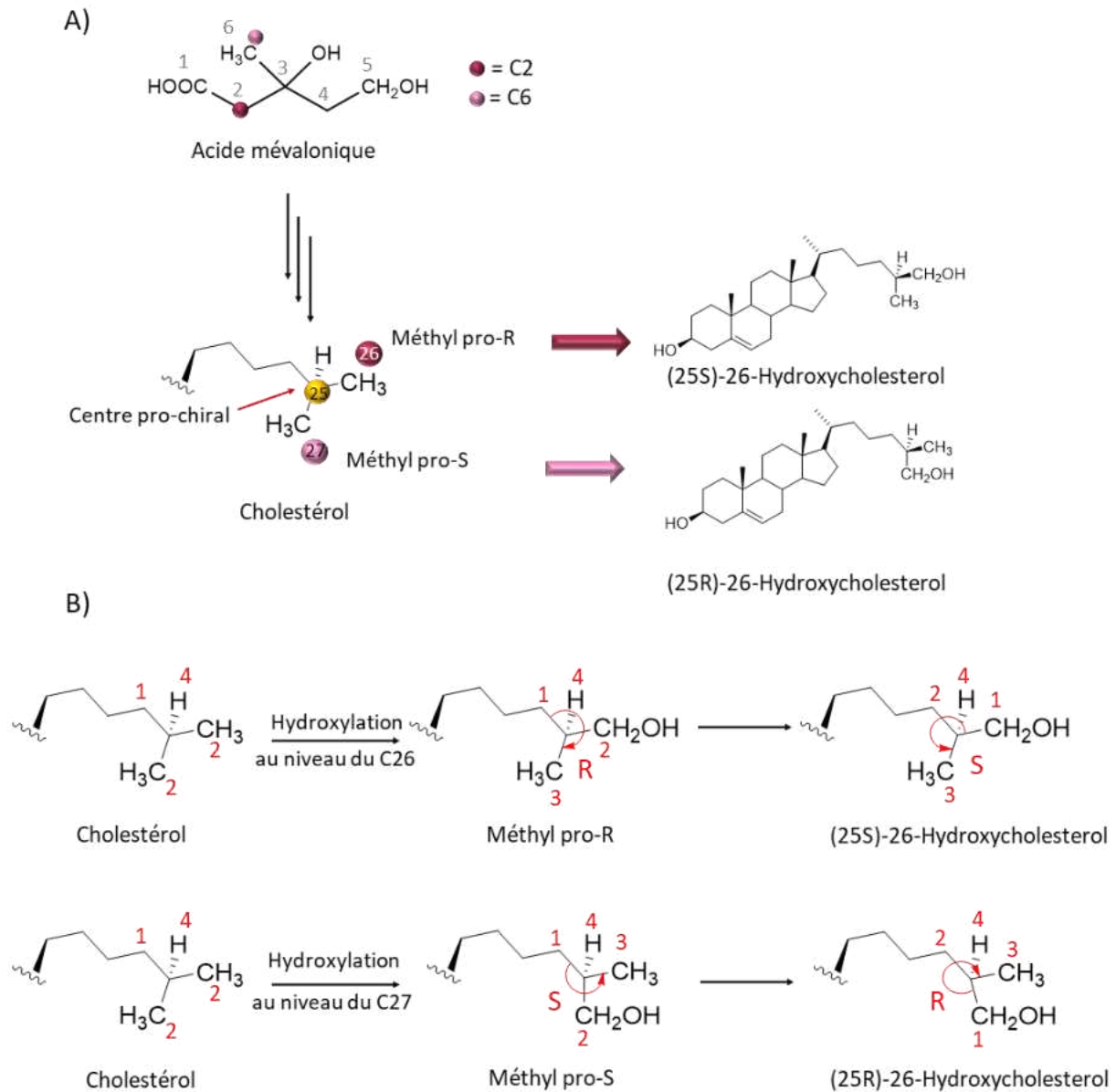


Figure 33: A) Origine des groupes méthyles terminaux de la chaîne latérale du cholestérol à partir des carbones C2 et C6 du précurseur acide mévalonique. La position C25 est un centre prochiral puisque la substitution stéréospécifique des groupes méthyles terminaux, désignés pro-R et pro-S, produit respectivement les diastéréoisomères 25(S)- et 25(R)- 26-Hydroxycholestérol. B) Détails sur la stéréochimie et l'ordre de priorité basé sur les règles de Cahn-Ingold-Prelog conduisant à la formation des diastéréoisomères (25S)-26-Hydroxycholestérol et (25R)-26-Hydroxycholestérol. Les atomes sont classés de l'atome le plus lourd au plus léger. Après numérotation, si le sens de rotation est horaire, le carbone est Rectus (R) ; si le sens de rotation est antihoraire, le carbone est Sinister (S).

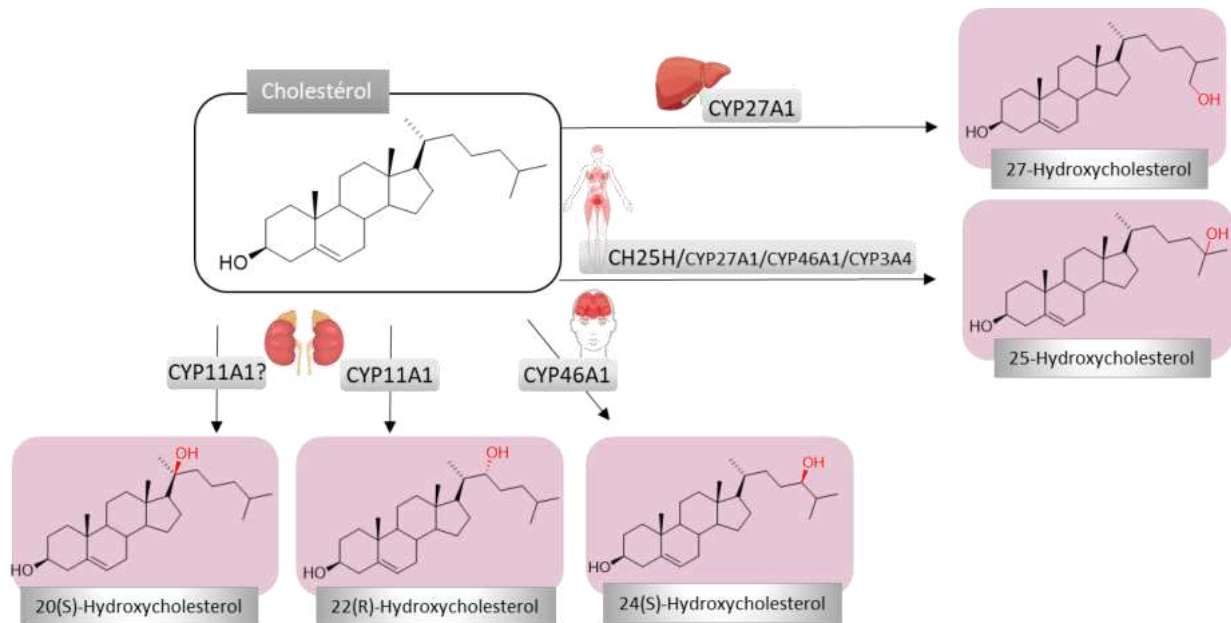


Figure 34: Les oxystérols formés par voie enzymatique à partir de l'hydroxylation de la chaîne latérale du cholestérol.

#### 2.2.2.2. Rôle du 25-HC dans le métabolisme du cholestérol

En raison de la faible expression de la CH25H dans le foie (E. G. Lund et al. 1998), un organe où la voie de biosynthèse du cholestérol est très active, et bien que la déficience de la Ch25h chez les souris n'altère pas le l'homéostasie du cholestérol (Yaqiong Wang et al. 2022), le rôle du 25-HC dans la régulation du métabolisme du cholestérol est souvent discuté. Il est à noter que d'autre part, certaines enzymes peuvent assurer de façon marginale la biosynthèse du 25-HC (voir section IV). Par ailleurs, il a été observé qu'un régime riche en lipides chez la souris entraîne une augmentation de la production du 25-HC, d'un facteur de 8, passant d'un niveau détectable à l'état de trace de moins de 5 ng/g dans le foie à 40 ng/g (Johnson et al. 1994). De plus, tant l'expression de la CH25H que la production du 25-HC augmentent dans les macrophages des tissus adipeux humains, présentant une corrélation avec l'indice de masse corporelle des sujets étudiés (Russo et al. 2020). Cependant, l'évidence majeure en faveur d'un rôle direct du 25-HC dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol cellulaire est corroborée par le fait que le 25-HC agit comme un inhibiteur de l'HMGCR, modulant ainsi la production de cholestérol dans les cellules. Des études ont montré que l'administration d'une faible et unique dose de 25-HC (1 $\mu$ M) chez les souris entraîne une réduction de 48 % de l'activité hépatique de la HMG-CoA réductase (Johnson et al. 1994). Ces observations mènent par la suite à conclure qu'une concentration intracellulaire élevée de cholestérol stimule la

production du 25-HC, qui à son tour inhibe la voie INSIG/SCAP/SREBP-2 (voir section 1.6) en se liant à INSIG, empêchant ainsi le transport de SREBP-2 vers l'appareil de Golgi, entraînant une diminution de la transcription de gènes cibles tels que l'HMGCR et le LDLR (Radhakrishnan et al. 2007) .

### 2.2.2.3. Rôle du 25-HC dans l'immunité

Dans la littérature, le 25-HC se distingue comme l'un des métabolites du cholestérol le plus étudié, en partie en raison de sa disponibilité commerciale et de son coût avantageux, par exemple, moins de 300 € les 10 mg chez Merck (en 2024). Parmi ces études, certaines ont révélé son importance dans l'immunité. Les premières études réalisées par Diczfalusy et ses collègues (Diczfalusy et al. 2009) *in vitro* sur des macrophages murins en culture ont montré que lorsque les récepteurs de type toll 4 (TLR4) des macrophages sont stimulés par le lipopolysaccharide (LPS, endotoxine), l'expression de la Ch25h augmente jusqu'à 35 fois, accompagnée d'une augmentation de 6 à 7 fois de la production de 25-HC. Dans la même étude, l'injection par voie intraveineuse de LPS chez huit volontaires sains a entraîné une augmentation de la concentration plasmatique du 25-HC (Diczfalusy et al. 2009). Cette observation a également été confirmée *in vivo* chez la souris par Bauman et ses collègues (Bauman et al. 2009), où l'expression de la Ch25h a augmenté après l'injection de l'agoniste sélectif du TLR4, le Kdo2-Lipid A (KDO). Cette augmentation de l'expression de Ch25h a été observée dans tous les tissus examinés chez la souris, avec une plus forte augmentation observée dans le foie (environ 250 fois), suivie du cœur (environ 50 fois), du cerveau (environ 30 fois), des poumons (environ 20 fois), et d'autres tissus tels que les muscles, les reins et le thymus (augmentation d'environ 8 à 12 fois) (Bauman et al. 2009). Ses études ont également montré que le traitement des lymphocytes B naïfs avec le 25-HC utilisé à une concentration nanomolaire (nM) entraîne l'inhibition de la prolifération des lymphocytes B induite par l'interleukine 2 (IL-2), réprime l'activation induite par la cytidine désaminase et par conséquent inhibe le changement de classe vers l'immunoglobuline A (IgA) (Bauman et al. 2009). En plus de la production du 25-HC par les macrophages en réponse à la stimulation du TLR4, les travaux de Park et Scott (Park et Scott 2010) ont également montré une augmentation de la Ch25h dans les cellules dendritiques (DCs) murines en réponse à l'activation du TLR4 et du TLR3 par leurs agonistes respectifs le LPS et le poly (I :C). Ils ont



décrit que la régulation de la Ch25h est indirectement contrôlée par la production d'IFN de type I et la transmission de signaux à travers leur récepteur IFN (IFNAR) ainsi que la voie des protéines Janus kinase (JAK)/activateur de la transcription 1 (STAT1) (Park et Scott 2010). Un peu plus tard, des études ont montré que le gène *Ch25h/CH25H* est un gène qui peut être stimulé en réponse à une activation immunitaire et le produit de cette stimulation, le 25-HC, a été reconnu comme ayant des propriétés antivirales contre de nombreux virus possédant (S.-Y. Liu et al. 2013) ou non (Civra et al. 2014) une enveloppe virale, en agissant à divers stades de leur cycle d'infection. Il a également été rapporté que le 25-HC présente des actions anti- (Reboldi et al. 2014; Dang et al. 2017) et pro- inflammatoires (Gold et al. 2014; H. Fu et al. 2014) en fonction du modèle étudié. Les effets protecteurs semblent apparaître à des concentrations de l'ordre de 1µM, tandis que les effets pro-inflammatoires sont observés à des concentrations supérieures à cet ordre.

#### 2.2.2.4. Rôle du 27-HC dans le métabolisme du cholestérol

Les premières études menées *in vitro* sur des lignées cellulaires hépatiques (Javitt et Budai 1989) et extra-hépatiques (Esterman et al. 1983; Taylor et al. 1984) ont montré que le 27-HC inhibe la biosynthèse du cholestérol en réduisant l'activité de l'HMGCR d'environ 40 % (Esterman et al. 1983). Cependant, les concentrations requises pour inhiber l'HMGCR au niveau des cellules hépatiques étaient de l'ordre de 6 µM (contre environ 0,25 µM au niveau des cellules non-hépatiques), ce qui est supérieur aux niveaux endogènes du 27-HC généralement situés entre 0.17 µM-0.5 µM (Burkard et al. 2004). En raison du métabolisme constant des acides biliaires par les cellules hépatiques, une partie du 27-HC est transformée en acides biliaires, suggérant que le 27-HC joue un rôle important dans la régulation du métabolisme du cholestérol principalement dans les tissus extra-hépatiques (Miao et al. 1988). Le 27-HC contribue également à réguler les niveaux de cholestérol en se liant à INSIG pour prévenir sa dégradation protéasomale, ce qui, à son tour, entraînant la rétention du complexe SREBP-2-SCAP dans le réticulum endoplasmique et par conséquent l'inhibition de la biosynthèse du cholestérol (Radhakrishnan et al. 2007; Saito et al. 2023).



### 2.2.2.5. Relation entre le 27-HC et le cancer du sein

#### I. Cancer du sein

Selon les derniers chiffres de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le cancer du sein est le type de cancer le plus fréquent et le plus mortel chez la femme, tant à l'échelle mondiale qu'en France. Il se classe en première position devant les cancers colorectaux et pulmonaires en termes d'incidence et de mortalité chez les femmes. En 2022, sa prévalence a été estimée à 2,3 millions de nouveaux cas chez les femmes, entraînant environ 670 000 décès dus au cancer du sein dans le monde.

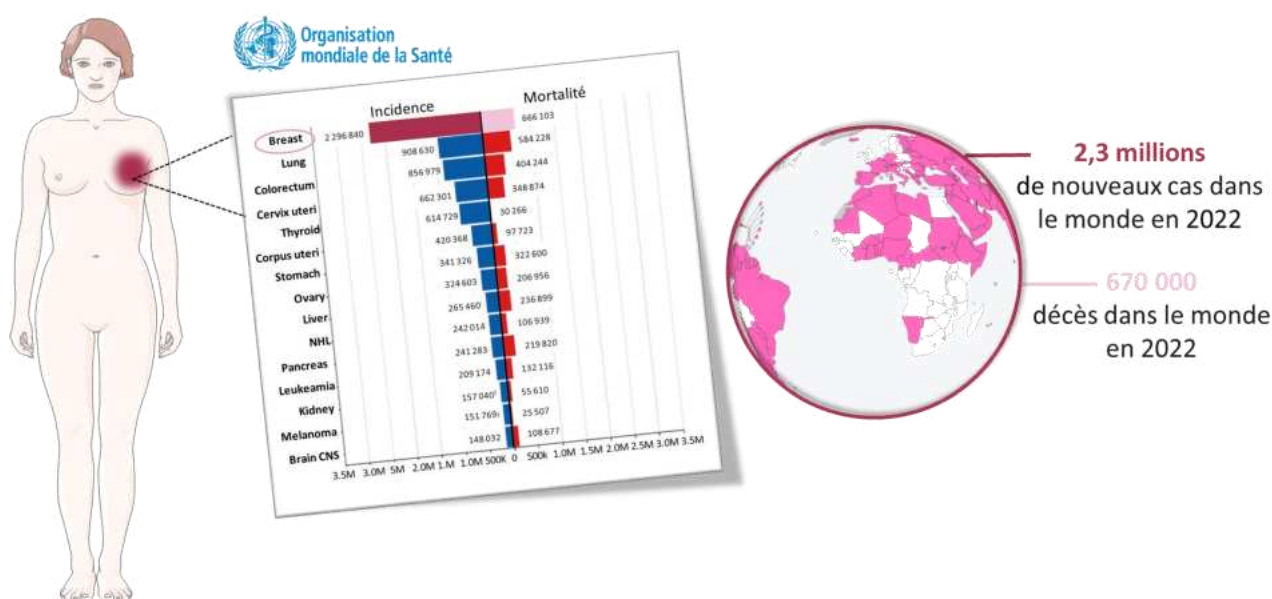


Figure 35. Incidence du cancer du sein dans le monde, données consultées à l'adresse <https://www.who.int/fr>.

Le cancer du sein est de nature hétérogène, composé de divers sous-types ayant des caractéristiques biologiques et pathologiques distinctes. Cette hétérogénéité a conduit à la classification du cancer du sein en plusieurs sous-types distincts, ayant chacun des caractéristiques biologiques ce qui a un impact significatif sur la prise en charge, les réponses aux traitements et le pronostic vital (Perou et al. 2000; Sørli et al. 2001). Bien que de nombreux biomarqueurs prometteurs existent, généralement seuls trois sont couramment utilisés en pratique clinique mondiale : les récepteurs hormonaux (HR), incluant les récepteurs des œstrogènes (ER) et de la progestérone (PR), ainsi que l'oncogène HER2 (récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain) en plus du marqueur de prolifération le Ki-67 (Rakha et al. 2010).

## II. Critères moléculaires

### 1) Récepteurs hormonaux

#### a) Récepteurs des œstrogènes (ER)

Les œstrogènes sont composés d'un ensemble de 4 hormones stéroïdiennes (E1-4) naturellement produites par l'organisme à partir du cholestérol via la formation de la prégénolone conduisant à : l'œstrone (E1), le 17 $\beta$ -œstradiol (E2), l'œstriol (E3) et l'œstétrol (E4) (Figure 36) (Coelingh et al. 2008), parmi lesquels l'E2 est l'espèce prédominante et le ligand ER le plus active biologiquement (Jozan et al. 1981; Nilsson et al. 2011) Cependant, chez les femmes ménopausées, l'E1 et l'E3 ainsi que l'E4 chez les femmes enceintes sont également susceptibles d'être des ligands physiologiquement importants des ER (Kasarinaitė et al. 2023).

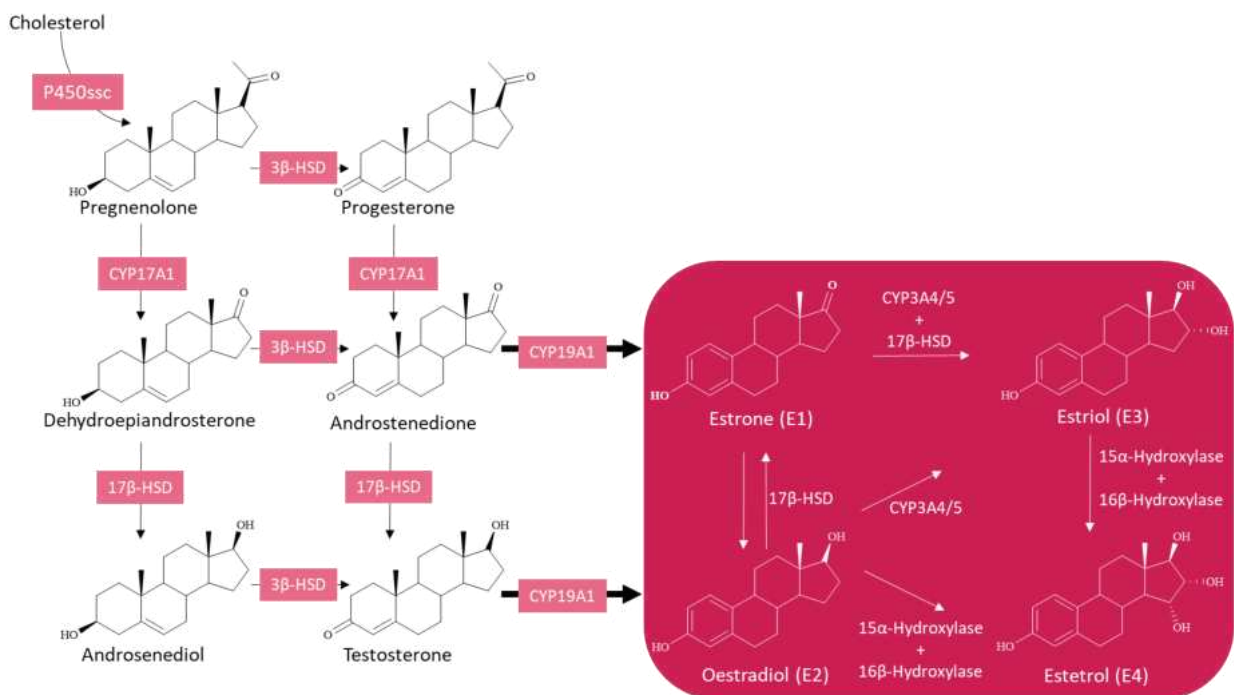


Figure 36 Biosynthèse des hormones sexuelles in vivo : Synthèse de la progestérone, testostérone et des œstrogènes chez l'humain. La stéroïdogenèse commence par le clivage de la chaîne latérale du cholestérol via la P450ssc (CYP11A1) conduisant à la formation de la prégénolone, qui est ensuite convertie en progestérone par la 3-hydroxystéroïde déshydrogénase 3 $\beta$ -HSD. La progestérone est ensuite transformée en androgènes, l'androstènedione via 17 $\alpha$ -hydroxylase (CYP17A1) puis en testostérone, la 17-hydroxystéroïde déshydrogénases (17 $\beta$ -HSD). L'aromatase (CYP19A1) peut catalyser ensuite la formation de l'E1 (œstrone) ou de l'E2 (œstradiol, 17 $\beta$ -œstradiol) à partir de l'androstènedione et de la testostérone, respectivement. L'interconversion entre l'E1 et l'E2 est régulée par les 17-hydroxystéroïde déshydrogénases 17 $\beta$ -HSD. L'œstriol (E3) est synthétisé à partir de E1 ou E2 via deux CYP450 (CYP3A4, CYP3A5) Enfin, l'œstétrol (E4) est produit à partir de l'E2 et l'E3 dans le par l'action des cyp450 15 $\alpha$ - et 16 $\alpha$ -hydroxylases, adaptée selon (Kasarinaitė et al. 2023).

Les œstrogènes jouent un rôle ubiquitaire dans l'organisme en intervenant dans la régulation d'un certain nombre de processus physiologiques chez la femme et l'homme tels que la régulation du cycle menstruel et la reproduction, le développement du tissu mammaire et des organes sexuels, la densité osseuse, l'inflammation et les fonctions cérébrales et cardiovasculaires (Liang et Shang 2013) (Figure 37).

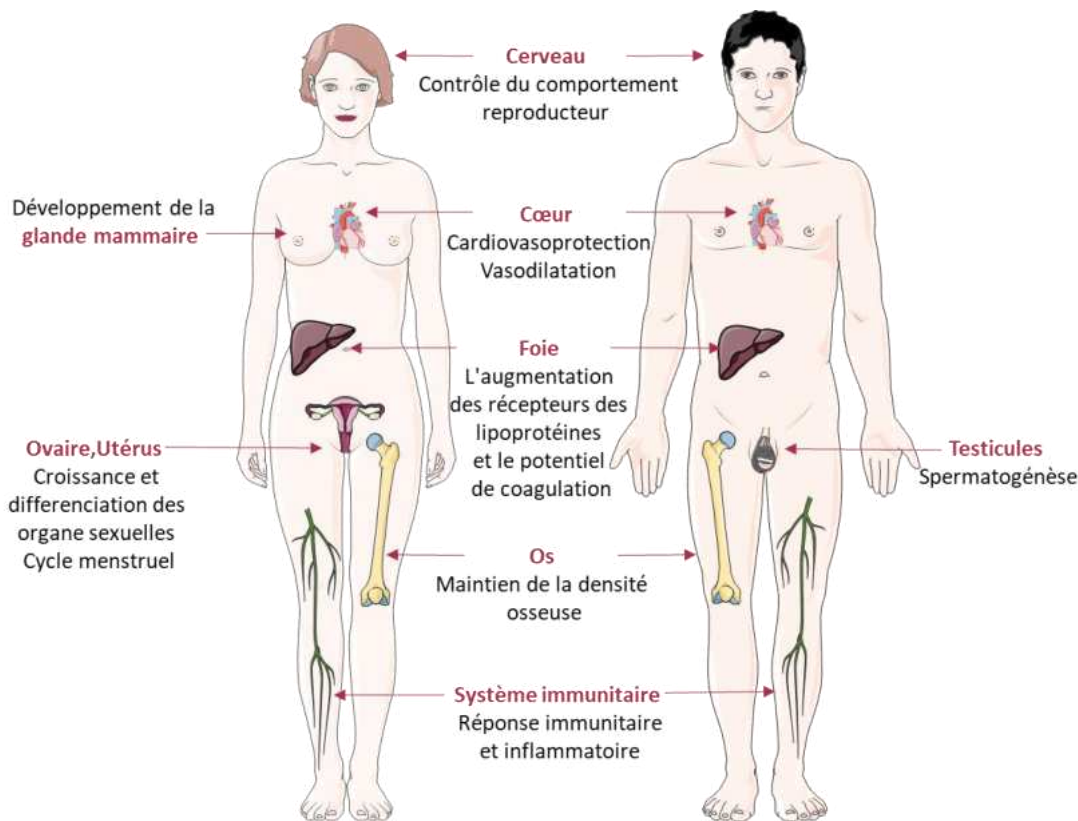


Figure 37: Rôle physiologique des œstrogènes chez l'Homme. Repris selon (Gruber et al. 2002).

Une fois synthétisés, les œstrogènes sont libérés et agissent en se fixant à différents récepteurs aux œstrogènes qui possèdent des propriétés propres à chacun. C'est à la fin des années 1950, qu'Elwood Jensen a découvert le premier ER (Jensen et Jordan 2003). En 1996, un second récepteur a été identifié : le premier est nommé ER $\alpha$ , tandis que le second est désigné comme ER $\beta$  (Mosselman et al. 1996; Kuiper et al. 1996). Les récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  sont codés respectivement par les gènes *ESR1* et *ESR2* (Lauber et al. 2022), présentant une forte homologie d'environ 96% dans leurs domaines de liaison à l'ADN et une identité de séquence de 53% dans leur LBD ( Kuiper et al. 1996). Les ER font partie de la super famille des récepteurs nucléaires ligand-dépendant intracellulaire. L'activité de ER $\alpha$  est modulée par les œstrogènes et par les agonistes ou antagonistes de synthèse (Nilsson et al. 2011). Les ER $\alpha$  et

ER $\beta$  sont largement exprimés dans de nombreux tissus tels que l'utérus, l'ovaire, la glande mammaire, l'os, la prostate, le poumon, le système cardiovasculaire et le cerveau (Figure 38). Les niveaux d'expression et les sous-types des ER sont des facteurs primordiaux qui déterminent la réponse spécifique aux œstrogènes selon les tissus (Biaison et al 2022).

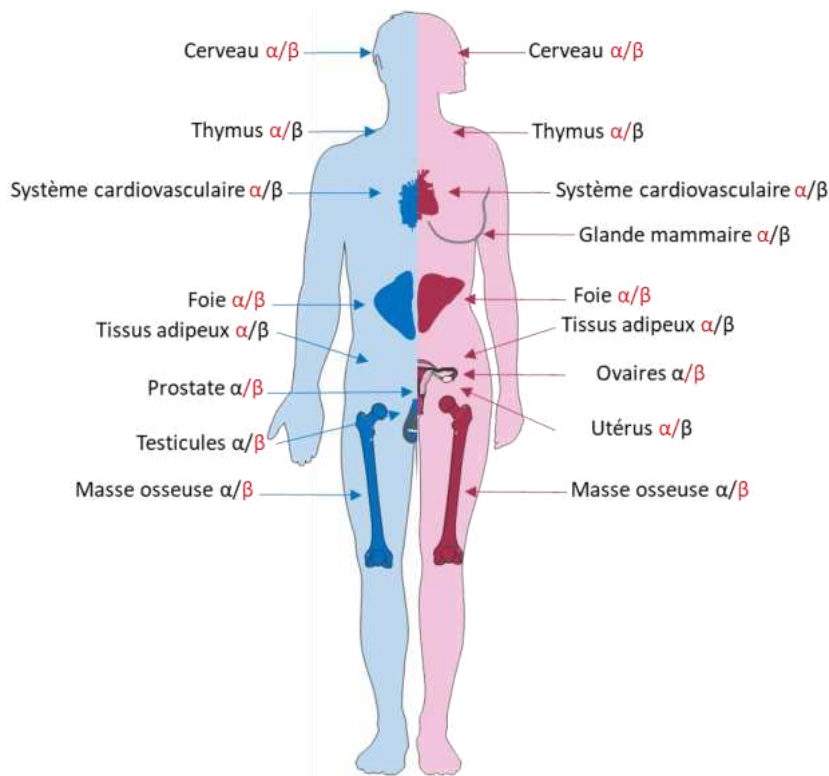


Figure 38 : Expression des récepteurs des œstrogènes dans le corps chez les individus de sexe masculin (bleu, à gauche) et de sexe féminin (rose, à droite). En cas d'expression différentielle, le récepteur prédominant est indiqué en rouge selon (Biaison-Lauber et Lang-Muritano 2022).

Le récepteur ER $\alpha$  est surexprimé dans plus de 80 % des cancers du sein. L'œstradiol (E2) stimule la progression de ces cancers, faisant de ce récepteur une cible majeure pour le traitement par hormonothérapie du cancer du sein (Anderson et al. 2002) et cette positivité constitue un critère pronostique significatif. Les tumeurs ER $\alpha$ -positives (ER $\alpha$ +) sont généralement bien différenciées, moins agressives et présentent de meilleurs résultats post-chirurgie comparées aux tumeurs ER $\alpha$ -négatives (ER $\alpha$ -). Seules les patientes avec des tumeurs ER $\alpha$  peuvent bénéficier de l'hormonothérapie, bien que des études cliniques indiquent que 10 à 20 % des patientes ayant des tumeurs ER $\alpha$ - répondent à ce traitement (Putti et al. 2005; Dunnwald et al. 2007).

### b) Récepteurs de la progestérone (PR)

La progestérone est une hormone stéroïdienne qui possède une diversité de fonctions biologiques, jouant un rôle important dans le cycle menstruel et la grossesse. Elle est synthétisée à partir du cholestérol (Figure 36). L'action de cette hormone se fait via son récepteur : le récepteur de la progestérone (PR) (*NR3C3*) qui est, tout comme le ER, une protéine appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires stéroïdiens. Le PR a été cloné pour la première fois en 1986 par le groupe d'Edwin Milgrom (Loosfelt et al. 1986) et existe sous deux isoformes: PR $\alpha$  et PR $\beta$  (Richer et al. 2002). Ce récepteur active la transcription de gènes après fixation du ligand (Obr et Edwards 2012), pouvant réguler des fonctions majeures reproductrices chez la femme et contrôle le développement de la glande mammaire, la prolifération, les processus de différenciation au cours du cycle ovarien mais aussi la grossesse. Son action dépend fortement du type cellulaire, et de l'environnement hormonal entre autres. L'expression du PR est également évaluée dans le cancer du sein. Son expression est retrouvée dans 65 à 75% des cas de ER $\alpha$ + (Ravdin et al. 1992; Stendahl et al. 2006), et l'expression de ce récepteur est considérée comme un indicateur de fonctionnalité d'ER $\alpha$ , car l'ER $\alpha$  régule l'expression du PR (Lee et al. 1996). Ainsi, la surexpression du PR constitue un biomarqueur prédictif pour les traitements du cancer du sein. Cependant, toutes les tumeurs ER $\alpha$ + ne sont pas doublement positives ER $\alpha$ +/PR+, environ 40% des tumeurs ER $\alpha$ + sont PR- (Rakha et al. 2007) et moins de 5 % ER $\alpha$ - sont tout de même PR+ (Hopp et al. 2004).

### c) L'oncogène HER2

HER2 fait partie des récepteurs épidermiques humains du facteur de croissance (HER) comprenant 4 isoformes : HER1 ou (EGFR), HER2, HER3 et HER4, des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase dont les gènes codant pour ces récepteurs sont *ERBB1/2/3/4* respectivement (Zhu et al. 2024) . Contrairement aux autres récepteurs de cette famille, le HER2 est un récepteur orphelin dont la dimérisation, nécessaire à son activation, se produit sans la liaison d'un ligand (Cho et al. 2003). Son activation entraîne la phosphorylation des tyrosines dans le domaine intracellulaire, déclenchant une cascade de signalisation qui menant à la croissance et la prolifération cellulaire, à la régulation de la différenciation cellulaire, à l'angiogenèse et à l'apoptose (Kostyal et al. 2012). La surexpression anormale de l'oncogène HER2 dans les cancers du sein, par une amplification du gène *ERBB2*, est cliniquement reconnue depuis 1987 (Slamon et al. 1987), et sa recherche est cruciale en

clinique car elle constitue à la fois un facteur pronostic important et un indicateur de réponse aux divers traitements anti-HER2 (Swain et al. 2023).

#### d) Ki-67

Ki-67 (identifiée avec le clone 67 à l'Université de Kiel) est une protéine nucléaire codée par le gène *MKI-67*, exprimée dans le noyau au cours des différentes phases du cycle cellulaire avec une expression plus levée pendant la phase mitotique (Uxa et al. 2021). Elle permet de maintenir les chromosomes séparés au cours de la télophase en agissant comme un surfactant naturel à la périphérie chromosomique, et est absente dans les cellules quiescentes (Cuylen et al. 2016). Identifiée pour la première fois en 1983, cette protéine reflète la prolifération et la cinétique tumorales (Gerdes et al. 1983). En raison de sa fonction proliférative, il est désormais utilisé comme biomarqueur en cancérologie mammaire à des fins pronostiques ou de réponse immédiate à la chimiothérapie (Reyal et al. 2013).

### III. Classification mondiale du cancer du sein

Toutes ces caractéristiques permettent une classification des tumeurs en sous-types moléculaire pour une meilleure adaptation thérapeutique (Figure 39). Les principaux sous-immunophénotypes de cancer mammaires chez la femme sont les suivants (Dai et al. 2016) :

- Les cancers mammaires luminaux, représentant 70% des cancers du sein invasifs, positifs pour ER +/- PR (Schnitt 2010), séparés en deux catégories :
  - **Cancer du sein de type «luminal A»**: Expriment ER +/- PR et la protéine HER2 est non surexprimée avec un index de prolifération Ki-67 faible (Anderson et al. 2002), représentant 70% des cancers du sein (Eroles et al. 2012) [BREASTCANCER.ORG](https://www.breastcancer.org). Ce sous-type tumoral est associé à un meilleur pronostic et à une bonne réponse à l'hormonothérapie et un taux de survie plus important que les autres sous-types (Dai et al. 2016).
  - **Cancer du sein de type «luminal B»**: Expriment ER +/- PR, peut surexprimer HER2, mais possédant un index Ki-67 élevé, représentant 15-20% des cancers du sein (Eroles et al. 2012) [BREASTCANCER.ORG](https://www.breastcancer.org). Ce sous-type tumoral a un pronostic moins bon que le groupe Luminal A (Eroles et al. 2012).

Le traitement repose principalement sur l'hormonothérapie, incluant les inhibiteurs de l'aromatase CYP19A1 de troisième génération, chez les patientes post-ménopausées tels que l'exemestane et l'anastrozole, les modulateurs sélectifs des récepteurs des



œstrogènes (SERM) tels que le tamoxifène (Tam) (Jordan 2003), et les destructeurs sélectifs purs des récepteurs des ER $\alpha$  comme le fulvestrant (Eroles et al. 2012). En plus de la chirurgie, la radiothérapie et dans certains cas, la chimiothérapie peut être envisagée. Si le HER2 est exprimé, des thérapies ciblées comme le trastuzumab (Herceptin) peuvent être ajoutées (J. Wang et Wu 2023).

- Les cancers mammaires n'exprimant pas le ER sont également séparés en deux catégories :
  - **Cancer du sein « HER2 positif »**: Exprimant ou amplifiant HER2 et négatif pour ER et PR, représentant 15-20% des cancers du sein (Gutierrez et Schiff 2011) [BREASTCANCER.ORG](https://www.breastcancer.org). Ce sous type est fréquemment associé à un mauvais pronostic et au développement de métastases (Swain et al. 2023)

La prise en charge du cancer du sein HER2 positif inclut une thérapie ciblée. Les traitements courants sont le trastuzumab (Herceptin) et le pertuzumab (Perjeta), souvent utilisés en combinaison avec la chimiothérapie. En plus de ces thérapies, la chirurgie et la radiothérapie sont également employées après le traitement afin de réduire la taille de la tumeur et améliorer les résultats chirurgicaux. L'hormonothérapie peut également être intégrée au traitement dans le cas où les récepteurs hormonaux sont exprimés (J. Wang et Wu 2023).

- **Cancer du sein « triple négatif (TN) »** : sont négatifs pour ER, PR et ne surexpriment pas HER2. Ils ont le pronostic le plus défavorable et représentent 15-20% des cancers du sein [BREASTCANCER.ORG](https://www.breastcancer.org) (Zagami et Carey 2022).

En raison de l'absence de cibles hormonales ou HER2, les options de traitement se limitent principalement à la chimiothérapie. Les anthracyclines (doxorubicine) et les taxanes (paclitaxel) sont largement utilisés en complément à la chirurgie et à la radiothérapie. De plus, l'immunothérapie et les thérapies expérimentales peuvent être envisagées dans certains cas (J. Wang et Wu 2023).

En pratique, l'analyse de l'expression de ces biomarqueurs par immunohistochimie permet de déterminer le phénotype des cancers mammaires des patientes. En s'inspirant des travaux antérieurs de Sørli, Perou et leurs collègues (Perou et al. 2000; Sørli et al. 2001), diverses études ont enrichi cette liste avec de nouveaux marqueurs, affinant ainsi le sous-typage des

cancers du sein (Dai et al. 2016). Cependant, l'apparition de la résistance aux médicaments représente une menace pour le succès des thérapies ciblées. Pour surmonter cette résistance, il est crucial de développer des stratégies thérapeutiques qui prennent en compte les voies de signalisation compensatoires activées dans les cellules cancéreuses résistantes (Tong et al. 2018).

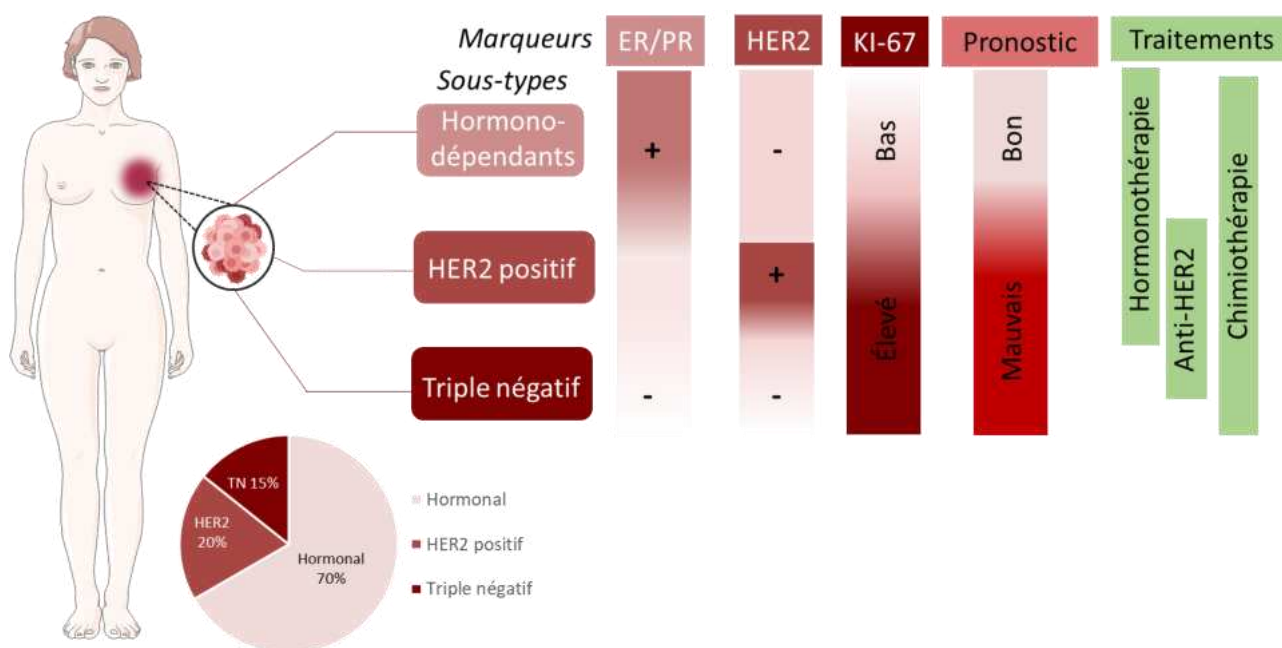


Figure 39: Classification moléculaire du cancer du sein selon les marqueurs mondiaux et leur pourcentage d'incidence.

#### IV. Implication du 27-HC dans le cancer du sein ER $\alpha$ +

La pharmacologie unique des ER $\alpha$  permet à certains ligands, comme le Tam, de déclencher des réponses spécifiques au tissu et au contexte. Ces ligands sont appelés les SERM (Smith et al. 2004). Depuis l'identification du 27-HC comme un ligand naturel des ER $\alpha$  et en raison que ses effets agoniste ou antagoniste observés selon les tissus, rappelant ceux du Tam, le 27-HC a été classé en tant que le premier SERM endogène identifié (Umetani et al. 2007). Cette molécule se lie aux ER $\alpha$  avec la capacité d'induire des changements conformationnels lui permettant d'agir comme un agoniste ou un antagoniste *via* le recrutement de co-activateurs ou de co-répresseurs différents selon les tissus. En 2008, peu après l'identification du 27-HC comme SERM endogène, une étude menée par DuSell et ses collègues a montré que le 27-HC pourrait avoir un rôle mitogène similaire à celui de l'E2 dans le contexte du cancer du sein ER+. Le 27-HC agirait comme un agoniste partiel en modulant l'activité transcriptionnelle du



récepteur ER $\alpha$ , et dans le cas de traitement de cellules ER $\alpha$ +, il stimule leur prolifération, et ce à des doses physiologiques (DuSell et al. 2008). En 2013, la même équipe a confirmé ces résultats *in vitro* sur différentes lignées cancéreuses ER $\alpha$ +, et a montré que le méthyl-pipéridino-pyrazole (MPP ; 1,3-bis(4-hydroxyphenyl)-4-méthyl-5-(4-(2-piperidinylethoxy)phenol)-1H-pyrazole), un antagoniste sélectif des récepteurs ER $\alpha$ , inhibe cet effet prolifératif du 27-HC, suggérant que les récepteurs ER $\alpha$  sont indispensables à la prolifération des cellules cancéreuses mammaires induite par le 27-HC. L'étude a également été menée *in vivo*, où l'administration durant 28 jours de 27-HC (100 $\mu$ g) exogène a stimulé la croissance des tumeurs mammaires dans des modèles murins de façon comparable à celles traitées avec l'E2 (28 $\mu$ g) (Wu et al. 2013). En parallèle, dans leur étude sur un modèle murin de cancer du sein ER $\alpha$ +, Nelson et ses collègues ont également montré que le 27-HC favorise la croissance tumorale par l'intermédiaire des ER $\alpha$ , tandis que l'activation des LXRs par le 27-HC est associée à ses effets pro-métastatiques. Les résultats suggèrent que les effets du 27-HC sur la croissance tumorale et les métastases dépendent respectivement des ER $\alpha$  et LXR (E. R. Nelson et al. 2013). La comparaison de l'expression des ARNm de l'enzyme oxystérol 7- $\alpha$ -hydroxylase (CYP7B1), enzyme responsable du catabolisme du 27-HC, et du CYP27A1, enzyme responsable de sa production, dans les tissus mammaires cancéreux ER $\alpha$ + et les tissus mammaires normaux a révélé que les niveaux du CYP27A1 étaient similaires dans les deux types de tissus, tandis que l'expression du CYP7B1 était diminuée dans les tumeurs ER+. De plus, l'augmentation du 27-HC produit par les macrophages associés aux tumeurs, combinée à la diminution de l'expression de CYP7B1, a été significativement associée à une plus grande agressivité tumorale et à une augmentation des métastases dans le cancer mammaire ER $\alpha$ + (E. R. Nelson et al. 2013). Cette augmentation du 27-HC observée ne serait pas due à une augmentation du CYP27A1, mais plutôt à une diminution de son métabolisme par le CYP7B1 (Wu et al. 2013).

Les données cliniques collectées sur les niveaux circulants de 27-HC par Wu et ses collègues (Wu et al. 2013) chez des patientes atteintes de cancer du sein, ainsi que celles obtenues par Lu et ses collègues de la cohorte EPIC (European Investigation into Cancer and Nutrition)-Heidelberg de 2019 (Lu et al. 2019) chez des individus dans le cadre d'une étude épidémiologique prospective sur la relation entre les niveaux circulants de 27-HC avant le diagnostic et le risque de développer un cancer du sein, et les résultats récents de la cohorte

MARIE (Mamma Carcinoma Risk Factor Investigation) (Decker et al. 2023), n'ont pas permis de mettre en évidence une corrélation positive entre les niveaux de 27-HC circulants et le risque de développer un cancer du sein. Cependant, ces études ont observé que le contenu en 27-HC était plus élevé dans les tissus mammaires adjacents des patientes atteintes de cancer du sein ER $\alpha$ + et une élévation encore plus marquée dans les tumeurs par rapport aux niveaux observés chez les témoins sains (Wu et al. 2013). Curieusement, l'étude de Lu a montré que des concentrations plus élevées de 27-HC circulant chez les femmes post-ménopausées étaient inversement associées au risque de cancer du sein (Lu et al. 2019) avec une association encore plus prononcée chez celles ayant les niveaux les plus élevés de testostérone (DeRouen et al. 2023). Cette relation inverse est cohérente avec les observations de Kimbung, qui ont observé qu'une expression tumoral plus élevée de CYP27A1 était associée à une survie globale et à une survie sans récurrence prolongées chez les patientes post-ménopausées atteintes de cancer du sein ER $\alpha$ + (Kimbung et al. 2020). Des données complémentaires issues des courbes de [Kaplan-Meier](#) (Györfy 2021) ont été établies pour les patients atteints de cancer du sein, comparant les quartiles les plus bas et les plus élevés d'expression de CYP7B1 et de CYP27A1. Ces données révèlent qu'une expression élevée par rapport à une expression faible de CYP27A1 augmente la survie sans récurrence dans tous les cancers du sein. En revanche, la survie est significativement réduite chez les patients ayant une faible expression de CYP7B1 par rapport à ceux ayant une expression élevée de cette enzyme (Wu et al. 2013). Ces résultats suggèrent que l'impact réel du CYP27A1 dans le cancer du sein reste encore à être déterminé. Cela peut être lié à sa diversité de substrats et à son rôle dans l'hydroxylation de différents composés, y compris ceux considérés comme toxiques, tels que le 7-KC, réduisant sa toxicité (voir section 4.1), laissant supposer que le CYP27A1 puisse agir sur d'autres métabolites associés à la cancérogenèse, exerçant ainsi un effet protecteur chez les patientes atteintes de cancer du sein.

### 2.2.3. Oxydation enzymatique au niveau du cycle stéroïdien

#### I. Hydroxylation enzymatique au niveau du cycle stéroïdien

Pendant de nombreuses années, la formation d'oxystérols par oxydation du noyau stéroïdien, menant aux ROX (ring oxysterols), a été considérée comme un artéfact résultant d'une auto-oxydation *ex vivo* du cholestérol durant la manipulation des échantillons (Griffiths et al. 2019). Cette perspective a évolué depuis avec la réalisation que le 7-KC peut également être formé par voie enzymatique à partir du 7-déhydrocholestérol via l'action du CYP7A1 (Shinkyo et al. 2011) (Figure 40). C'est sans doute la raison pour laquelle, les mutations génétiques caractérisées par l'accumulation du 7-DHC entraînent une augmentation des niveaux circulants du 7-KC (Björkhem et al. 2014). De plus, la structure cristalline obtenue du CYP7A1 complexé avec le 7-KC (référence PDB: [3V8D](#)) renforce l'hypothèse selon laquelle cette enzyme participe à la formation du 7-KC (Tempel et al. 2014). De plus, le 7 $\alpha$ -HC et le 7 $\beta$ -HC, peuvent également être produits par voie enzymatique. Le 7 $\alpha$ -HC peut être formé à partir du cholestérol par le CYP7A1, enzyme largement exprimée dans le foie. Cet oxystérol est un intermédiaire clé dans la voie de biosynthèse classique des acides biliaires (Björkhem et al. 2001) (voir section 2.3). Tandis que le 7 $\beta$ -HC et le 7-KC peuvent être inter-convertis par la 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (11 $\beta$ -HSD1), ce qui contribue à l'équilibre entre le 7-KC et le 7 $\beta$ -HC *in vivo* (Mitić et al. 2013). Ceci a été montré dans les travaux menés *in vivo* et *in vitro* par Hult (Hult et al. 2004), Schweizer (Schweizer et al. 2004), Larsson (Larsson et al. 2007), Mitić (Mitić et al. 2013) et leurs collègues. La 11 $\beta$ -HSD2 participe également à la conversion du 7 $\beta$ -HC en 7-KC (Raleigh et al. 2018 ; Griffiths et al. 2019) (Figure 40).

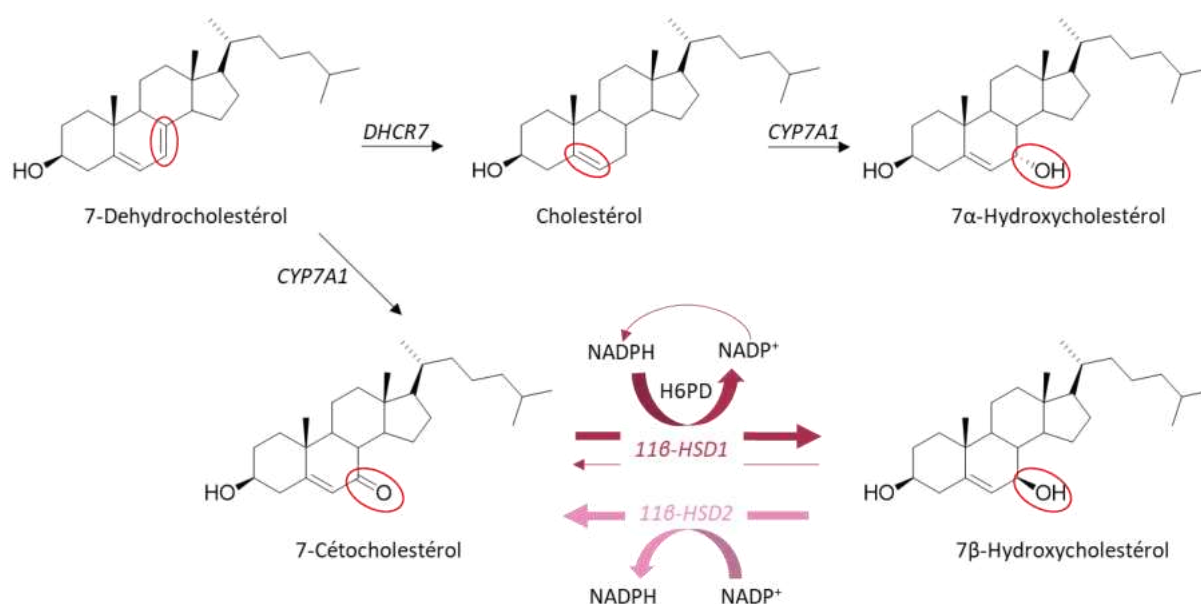


Figure 40: Voies enzymatiques menant à la formation des 7α-Hydroxycholestérol, 7β-Hydroxycholestérol et du 7-Cétocholestérol.

L'oxydation enzymatique du noyau stéroïdien conduit également à la formation de façon stéréosélective au 4β-HC à partir du cholestérol. Cette hydroxylation est principalement catalysée par le cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), le CYP450 le plus abondant dans le foie et l'intestin, qui est connu pour contribuer de manière significative au métabolisme des médicaments (Guengerich 1999). Les concentrations plasmatiques du 4β-HC varient généralement entre 10 à 60 ng/ml (25nM-150nM) en conditions normales, mais peuvent dépasser les 600 ng/ml (1500 nM) chez les patients traités par des médicaments antiépileptiques tels que la carbamazépine, un puissant inducteur du CYP3A4 (Diczfalusy et al. 2011). Les concentrations plasmatiques du 4α-HC n'ont pas été variées par les inducteurs du CYP3A4 et sont restées en moyenne à 6.6 ng/ml. Cette situation reflète le ratio du 4β-HC au 4α-HC retrouvé, qui est généralement supérieur à 3, indiquant l'origine enzymatique du 4β-HC (Bodin et al. 2001). Il a été reporté que le 4β-HC agit comme un agoniste du LXR (Janowski et al. 1996) et active l'expression de SREBP1c, stimulant ainsi la biosynthèse des acides gras et l'accumulation cellulaire de triglycérides sous forme de gouttelettes lipidiques à la fois *in vitro* et *in vivo* conduisant à la stéatose hépatique (Moldavski et al. 2021). Cela correspond au fait que l'un des effets secondaires connus de médicaments antiépileptiques est la prise de poids (Bodin et al. 2001). Par cette voie, le 4β-HC induit également l'expression de l'ABCA1 et l'ABCG1, favorisant l'efflux du cholestérol (Salonurmi et al. 2020).

## II. Epoxidation enzymatique du cholestérol au niveau des C5-C6

La présence de l'insaturation entre les carbones C5-C6 du cholestérol permet la formation des 5,6-ECs (5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ -EC). Cependant, peu d'études ont exploré leur formation par voie enzymatique, car initialement, ils étaient considérés comme des produits résultants uniquement de l'auto-oxydation du cholestérol (Griffiths et al. 2019). Les études menées au début des années 1970 ont cependant fourni des indications sur l'existence de voies enzymatiques impliquées dans leur formation. Les tests d'époxydation du cholestérol sur des homogénats tissulaires font apparaître des variations dans les rapports des époxydes 5,6 $\alpha$ -EC / 5,6 $\beta$ -EC tissus-dépendant. Martin et ses collègues rapportent une formation majoritaire du 5,6 $\alpha$ -EC dans un homogénat de foie de rat, suggérant l'existence d'une cholestérol-5,6 $\alpha$ -époxydase (Martin et Nicholas 1973). Watabe et Sawahata décrivent la formation stéréosélective du 5,6 $\alpha$ -EC via un CYP450 dans un homogénat de cortex surrénalien de bœuf (T Watabe et Sawahata 1979), apportant la première évidence de l'implication enzymatique de type CYP450 dans la conversion stéréospécifique du cholestérol en 5,6 $\alpha$ -EC. Ils ont en parallèle attribué cette activité enzymatique au CYP450<sub>scc</sub> (CYP11A1), observant dans le même extrait de cortex surrénal de bœuf la formation stéréospécifique de 5,6 $\alpha$ -EC, accompagnée de la production du 20R,22R-diHC et de la prégénolone (Watabe et Sawahata 1978 ). Dans un homogénat de foie de rat il semble que les 5,6-ECs soient produits majoritairement par hydroperoxydation lipidique. Ce processus, influencé par la présence d'ions ferreux, d'ADP et de NADPH, conduit à la formation des époxydes 5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ -EC dans un ratio de 1:2-4, selon la nature del'hydroperoxyde présent (Watabe et al. 1982; Tadashi et al. 1984). Cette transformation est inhibée lorsque les microsomes sont bouillis ou en l'absence de Fe<sup>2+</sup> et d'ADP, ainsi qu'avec l'ajout d'agents chélatants comme l'EDTA (Tadashi Watabe et al. 1980; Watabe et al. 1981), indiquant une implication d'une enzyme nécessitant ces cofacteurs. Ces données révèlent l'existence de divers mécanismes enzymatiques permettant la production stéréosélectivité des 5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ -EC, processus qui semblent être médiés par des enzymes de type CYP450, alors que la production de mélanges d'isomères semble se produire via des lipoperoxydases. L'étude de l'époxydation du cholestérol est cependant complexe car ces époxydes sont rapidement hydrolysés en CT par la ChEH. L'implication d'un ou plusieurs CYP450 en particulier dans la formation du 5,6 $\alpha$ -EC demeure un projet de recherche à explorer en raison de l'importance biologique des produits de

conjugaison récemment identifiés par mon équipe, comme les dendrogénines (voir section 6.1) (Poirot et Silvente-Poirot 2013b). L'expression ectopique de CYP450 dans des cellules, en présence ou en absence de cofacteur tels que le NADPH réductase devrait permettre leur identification.

### 2.3. Les acides biliaires (AB)

Les AB sont des molécules issues du cholestérol, avec lequel ils ont en commun le noyau stéroïdien mais possèdent une chaîne latérale de cinq atomes de carbone, contrairement à la chaîne de huit atomes de carbone du cholestérol (Figure 41) (Russell 2003). Le nombre et la position des groupes hydroxyles attachés aux C6, C7 et C12 de la structure stéroïdienne, ainsi que la nature du groupe X conjugué de la chaîne latérale sont à l'origine de la diversité des AB (Figure 41). Dans leur structure tridimensionnelle, ces groupements en fonction de leur position de part et d'autre du plan lui confèrent une face hydrophobe, et une face hydrophile (Ridlon et al. 2024). Leur biosynthèse implique une oxydation et un raccourcissement de la chaîne latérale du cholestérol du départ, puis la conjugaison de l'AB avec un acide aminé : la taurine ou la Glycine. Ces modifications déterminent ainsi leurs propriétés biologiques spécifiques par leur interaction sélective avec des récepteurs nucléaires tels que le récepteur X farnésioïde (FXR) et le récepteur X des pregnanes (PXR) (Mohanty et al. 2024).

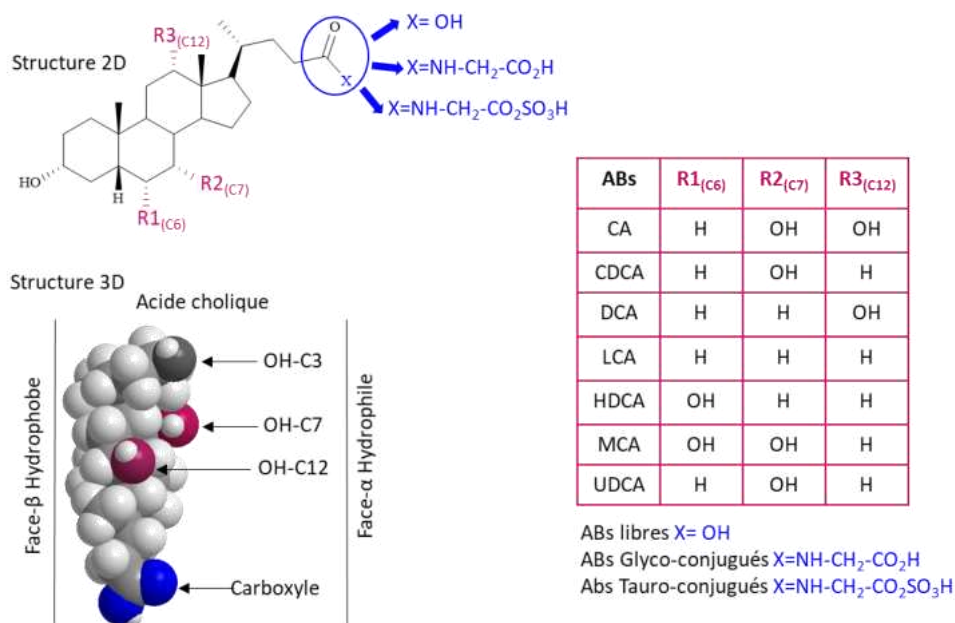


Figure 41 : Structure commune des AB 2D et 3D, avec ceux des plus courants chez différentes espèces: l'acide cholique (CA), l'acide chénodésoxycholique (CDCA), l'acide désoxycholique (DCA), l'acide lithocholique (LCA), l'acide hyodésoxycholique (HDCA), l'acide muricholique (MCA) et l'acide ursodésoxycholique (UDCA), selon (Ridlon et al. 2024).

Leur structure amphiphile en fait d'excellents détergents, jouant un rôle crucial dans la digestion et l'absorption des lipides et des vitamines liposolubles. Les concentrations d'acides biliaires sériques à jeun chez les individus en bonne santé se situent généralement entre 0,2 et 0,7  $\mu\text{M}$ , augmentant à 4-5  $\mu\text{M}$  après chaque repas (Di Ciaula et al. 2017). De plus, ces molécules détergentes activent aussi des voies de signalisation cellulaires complexes impliquées dans le maintien de l'équilibre des acides biliaires et du cholestérol, le métabolisme du glucose et des lipides dans le foie, l'équilibre énergétique, ainsi que dans la régulation de l'inflammation (Ridlon et al. 2024). La biosynthèse des AB primaires à partir du cholestérol se déroule dans le foie. Chez l'homme, les principaux AB primaires formés sont l'acide cholique (CA) et l'acide chénodéoxycholique (CDCA), passant par l'intermédiaire acide, le 3 $\beta$ -Hydroxycholest-5-ène-(25R)-26-oïque (acide cholesténoïque ; 3 $\beta$ -HCA) (Figure 43). Ce dernier est l'un des AB le plus abondant, avec une concentration plasmatique d'environ 80 ng/ml (Crick et al. 2014). Le 3 $\beta$ -HCA résulte de la double action de l'enzyme CYP27A1 sur le cholestérol en position C27 (Meaney et al. 2003), et peut ensuite être converti en acide 3 $\beta$ -Hydroxycholest-5-en-24-oïque (acide cholénique) (Mano et al. 2004), tout en conservant la stéréochimie du groupe 3 $\beta$ -OH et la double liaison en C5-C6. Ces AB présentent un grand intérêt sur le plan chimique car ils pourraient servir de plateforme pour la synthèse d'analogues d'oxystérols. Cette approche permettrait d'améliorer leur solubilité grâce à l'introduction d'un groupement acide et au raccourcissement de la chaîne latérale. En prenant exemple des formes époxydes, alors que les 5,6-ECs ont un coefficient de partage octanol/eau (logP) de 6,37, les 5,6-époxydes des formes AB du 3 $\beta$ -HCA et de l'acide cholénique présentent des logP de 5,21 ( $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$ ) et de 3,38 ( $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_3$ ), respectivement, les rendant ainsi moins hydrophobes (ChemBioDraw Ultra 14.0) (

Figure 42). Les AB primaires sont ensuite conjugués à la glycine et la taurine (3:1) par liaison amide (N-acyl amidation) afin d'accroître leur solubilité dans l'eau (glycine > taurine) (Rimal et al. 2024). Ils sont ensuite excrétés par le foie dans la bile et libérés dans la partie supérieure de l'intestin grêle par la vésicule biliaire. Dans l'intestin, les AB primaires sont transformés en AB secondaires tels que l'acide désoxycholique et l'acide lithocholique par les enzymes du microbiote intestinal. Les AB secondaires peuvent subir d'autres modifications structurales par les enzymes hépatiques via leur réabsorption et retour dans le foie par la veine porte (Danielsson 1973). La conversion du cholestérol en AB dans le foie implique une série



d'enzymes localisées dans quatre compartiments cellulaires distincts : le réticulum endoplasmique, la mitochondrie, le peroxisome et le cytoplasme. Deux principales voies métaboliques ont été identifiées : la voie « neutre ou classique », où les précurseurs des AB progressent majoritairement sous forme de stéroïdes neutres, et la voie « acide ou alternative », où les précurseurs des AB progressent sous forme d'acides carboxyliques (Vlahcevic et al. 1999). La contribution relative des deux voies dépend de l'espèce considérée, chez l'humain la voie neutre est considérée comme la voie la plus importante quantitativement pour la formation des AB primaires, conduisant à la production d'une quantité équivalente de CA et le CDCA, tandis que la voie acide contribue à une plus petite proportion du pool  $\leq 10\%$ , principalement sous forme de CDCA (Vlahcevic et al. 1999), mais peut devenir prédominante en condition pathologique (Crosignani et al. 2007). Alors que chez les rats, la contribution de cette voie acide est responsable de la production d'environ 50% des AB (Vlahcevic et al. 1999).

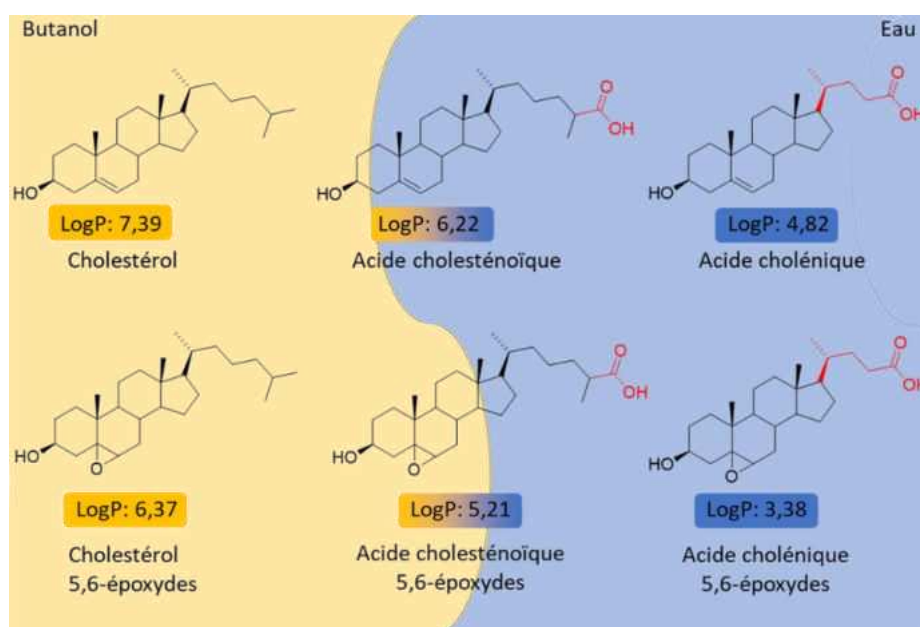


Figure 42 : Structure chimique et valeurs de logP du cholestérol, de l'acide cholesténoïque, de l'acide cholénique et de leurs formes époxydes ; Les valeurs de log P, qui indiquent la lipophilie des composés, sont calculées en déterminant le rapport des concentrations d'un composé entre une phase aqueuse et une phase organique, généralement l'octanol et l'eau. Des valeurs plus élevées de logP indiquent une plus grande hydrophobicité. Données obtenues à partir de ChemBioDraw Ultra 14.0.



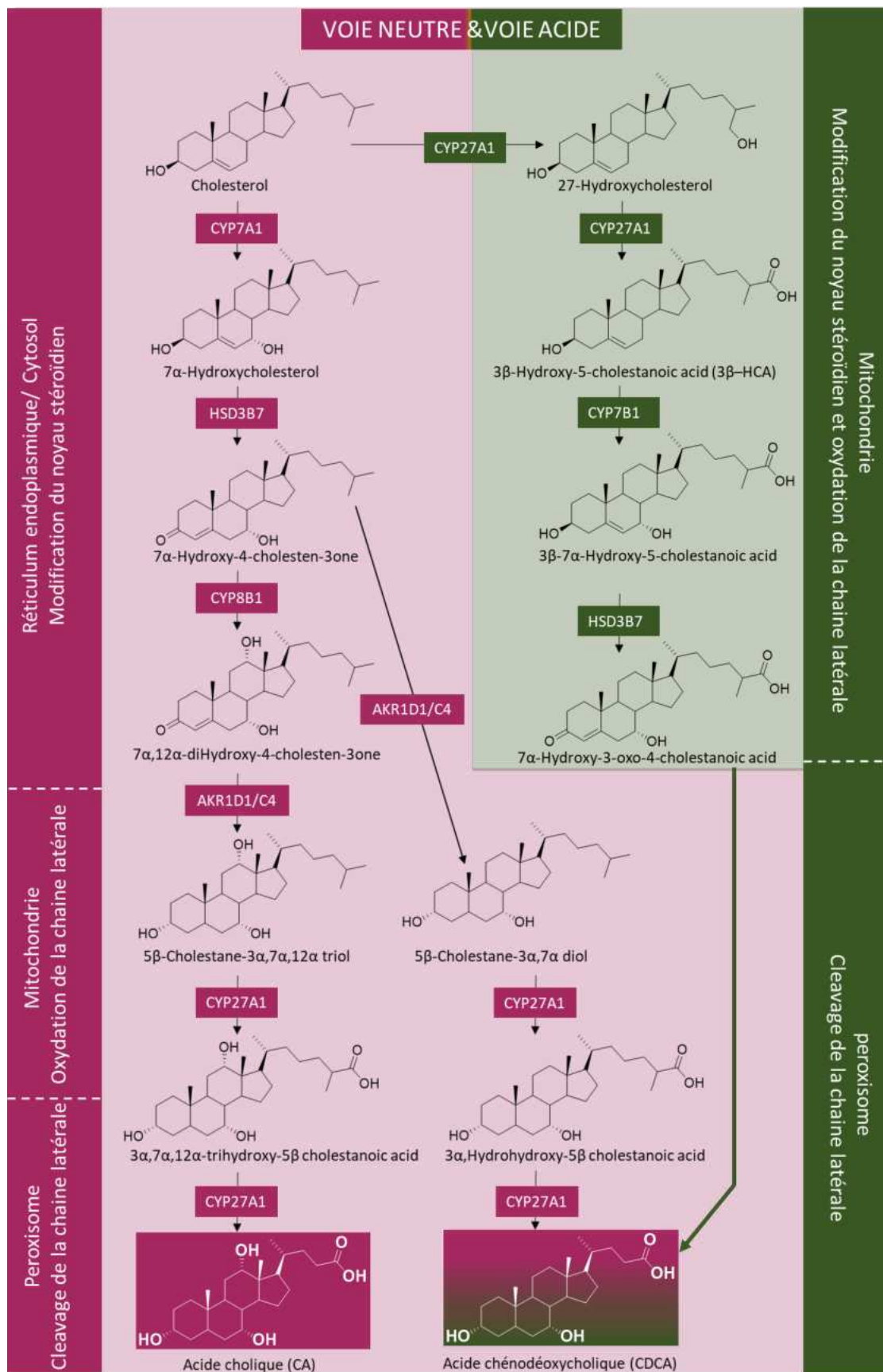


Figure 43: Schéma de la biosynthèse des acides biliaires à partir du cholestérol, incluant la voie neutre initiée par une hydroxylation en position 7α du cholestérol et la voie acide initiée par une 27-hydroxylation du cholestérol.

### 3. Récepteurs hépatiques nucléaires LXR aux oxystérols

#### 3.1. Structure et fonctions des LXRs

Les récepteurs LXRs font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires (NRs) (Shinar et al. 1994; Willy et al. 1995). Les LXRs existent sous la forme de deux isoformes provenant de deux gènes distincts : LXR $\alpha$  (*NR1H3*) et LXR $\beta$  (*NR1H2*) (Willy et al. 1995; Teboul et al. 1995), et partageant 77 % d'homologie de séquence dans leur domaine de liaison aux ligands LDB (Ligand binding domain) (Alberti et al. 2000). L'analyse des profils d'expression du gène montre que le LXR $\alpha$  présente une forte expression dans le foie (d'où son appellation de récepteur hépatique nucléaire) et des niveaux plus faibles mais significatifs, dans les glandes surrénales, l'intestin, les tissus adipeux, les macrophages, les poumons et les reins (Apfel et al. 1994; Willy et al. 1995). En revanche, LXR $\beta$  est exprimé de manière ubiquitaire dans l'ensemble des tissus (Shinar et al. 1994; Teboul et al. 1995). Les LXRs étaient à l'origine des récepteurs nucléaires orphelins car aucun ligand ne leur avait été associé. Après la découverte de leur activation par une classe d'oxystérols naturels, ils ont finalement été qualifiés de récepteurs nucléaires orphelins-adoptés (Janowski et al. 1996). Les LXRs forment des hétérodimères obligatoires avec leur partenaire le RXR, un récepteur nucléaire activé par l'acide 9-*cis* rétinolique (Willy et al. 1995). Le dimère LXR/RXR se lie à des régions spécifiques de l'ADN appelées éléments de réponse LXR (LXREs), qui sont constituées de répétitions directes (DRs) de la séquence AGGTCA séparée par 4 nucléotides (DR-4), situés dans les régions promotrices de gènes cibles (N. Zelcer 2006). De façon schématique, en absence de ligand au niveau du LBD, les complexes LXR/RXR recrutent des corépresseurs (Wagner et al. 2003) tels que NCoR (nuclear corepressor) ou SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors) (Hörlein et al. 1995; Chen et Evans 1995) qui recrutent des complexes transcriptionnels contenant des enzymes HDAC (histones déacétylases) spécifiques (Pazin et Kadonaga 1997). L'élimination des groupes acétyles des histones par les HDAC crée une charge positive au niveau de ces histones qui établissent alors par des interactions électrostatiques de forte énergie avec l'ADN qui est chargée négativement par ses groupements phosphates. Ceci permet un compactage de l'ADN dans la chromatine qui va empêcher l'expression de gènes (Pazin et Kadonaga 1997). En présence d'un ligand agoniste au niveau du BLD, le dimère LXR/RXR subit un changement conformationnel, conduisant à la libération des corépresseurs et au recrutement de coactivateurs tels que les SRCs (steroid receptor coactivator-1)

(Huuskonen, Fielding, et Fielding 2004) ou PGC-1 $\alpha$  qui recrutent cette fois-ci des complexes transcriptionnels contenant des enzymes HAT (histone acétyltransférase) (Puigserver et al. 1999), l'acétylation des amines primaires des lysines des histones neutralise celle-ci, ce qui conduit à une perte d'affinité entre l'histone et l'ADN. Cette perte d'affinité permet la décondensation de la chromatine et l'activation de la transcription de gènes (Figure 44).

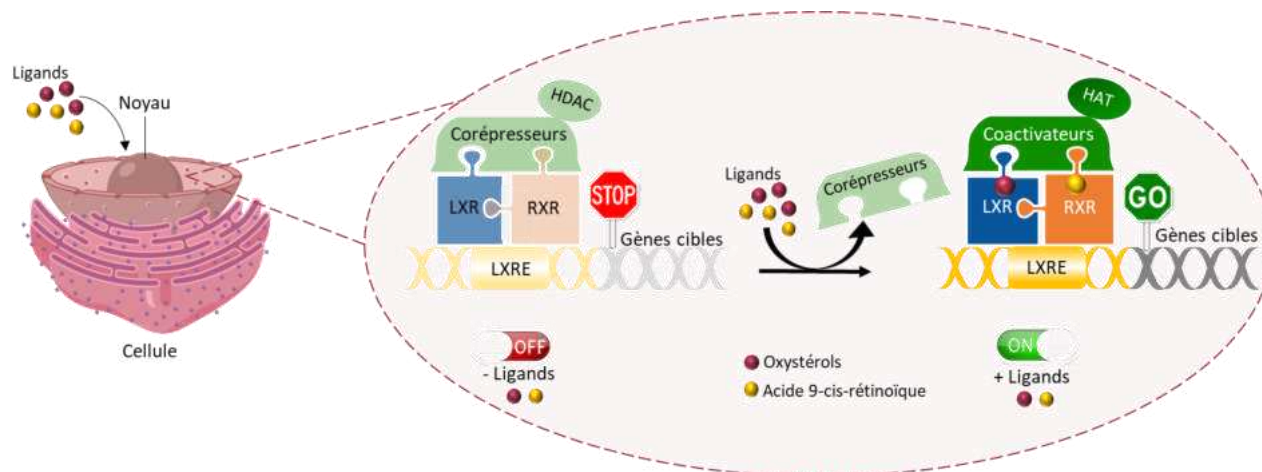


Figure 44 : En l'absence de ligand, un co-répresseur se lie à l'hétérodimère et inhibe son activité transcriptionnelle. La liaison de l'hétérodimère avec un ligand de RXR (acide rétinoïque 9-*cis*) ou de LXR (oxystérol) provoque le départ du co-répresseur et le recrutement d'un co-activateur, activant ainsi la transcription de gènes cibles.

### 3.2. Ligands endogènes des LXRs

Lors des premiers travaux visant à identifier les ligands des LXRs, des molécules appartenant à la famille des oxystérols ont été les premiers candidats identifiés comme ligands endogènes (Janowski et al. 1996). Des études structure-activité ont mis en évidence l'importance de la configuration 3 $\beta$  de l'hydroxyle des oxystérols dans son interaction avec les LXRs (Janowski et al. 1999), alors que la configuration 3 $\alpha$  de l'hydroxyle entraîne une perte d'affinité. De plus, les auteurs montrent dans cette étude, que la mono-oxygénation de la chaîne latérale du cholestérol est indispensable dans leur série pour permettre une liaison et une activation efficaces des LXRs. Cependant, l'ajout de plusieurs atomes d'oxygène sur cette chaîne réduit la capacité de liaison et d'activation du LXR par rapport aux analogues mono-oxygénés. Enfin, la stéréoisomérisation de l'oxystérol joue un rôle sélectif important. En effet, la modification de l'orientation spatiale de l'oxygène sur la chaîne latérale génère des stéréoisomères non naturels qui diminuent généralement, voire empêchent, leurs interactions avec les récepteurs (Janowski et al. 1999). Ces études ont révélé que les oxystérols suivants sont des ligands endogènes naturels des récepteurs LXRs : le 24-KC > 24(S)-HC > le 22(R)-HC > le 20(S)-HC > 4 $\beta$ -HC >>> 7 $\alpha$ -HC > le 25-HC > le 27-HC, tandis que le 7 $\alpha$ -HC, et le 7 $\beta$ -HC sont des ligands moins

efficaces des LXRs. En plus de ces oxystérols dérivés directement du cholestérol, le 24(S),25-époxycholestérol (24(S),25-EC) s'est avéré être le ligand LXR le plus efficace dans cette série oxystérol (Janowski et al. 1996; Lehmann et al. 1997; Peet et al. 1998b; Janowski et al. 1999). Le 24(S),25-EC se distingue par le fait qu'il n'est pas issu directement du cholestérol, mais est produit parallèlement à partir d'une dérivation de la voie du mévalonate où l'époxyde de squalène, au lieu de subir une cyclisation vers le lanostérol, est métabolisé en 24(S),25-EC par l'action de la squalène époxidase (SQLE) et la lanostérol synthase (LSS) (Thomas A. Spencer 1994). Métabolite endogène retrouvé dans le foie (Nelson et al. 1981; Spencer et al. 1985; Liu et al. 2024) ainsi que dans le cerveau (Yuqin Wang et al. 2009), où le CYP46A1 est décrit jouant un rôle dans sa biosynthèse soit à partir du desmostérol soit à partir du cholestérol par l'intermédiaire du 24(S)-HC et du 24(S),25-diHydroxycholestérol (Theofilopoulos et al. 2019). Ces divers oxystérols se lient aux LXRs à des concentrations comparables à celles observées dans les tissus, suggérant ainsi qu'ils jouent un rôle physiologique dans la régulation des LXRs (Janowski et al. 1999). Une autre classe de ligands endogènes agonistes des LXRs comprend les intermédiaires de la biosynthèse du cholestérol, caractérisés par une double liaison en C24 et l'absence de groupe hydroxyle sur la chaîne latérale, le desmostérol et le zymostérol (Yang et al. 2006) ainsi que le stérol FF-MAS (follicular fluid meiosis-activating sterol) produit via le cytochrome P450 14-déméthylase (CYP51) à partir du lanostérol (Janowski et al. 1996). Les molécules issues de la voie métabolique des acides biliaires, en particulier celles hydroxylées en position 6 $\alpha$ , ont été identifiées comme agonistes des LXRs avec une plus grande affinité pour le LXR $\alpha$ . Cela inclut l'acide hyodésoxycholique sous sa forme libre et conjuguée à la taurine (Song et al. 2000). Plus tard, la dendrogénine A (DDA), une molécule obtenue par condensation enzymatique régio- et stéréo-sélective du 5,6 $\alpha$ -EC avec l'histamine (voir section 5.4) (Philippe De Medina et al. 2013), a été identifiée comme une nouvelle classe d'alcaloïde stéroïdien modulateur des récepteurs LXRs (Segala et al. 2017a). Cette molécule est capable d'induire la redifférenciation et l'autophagie létale dans les cellules tumorales de différentes origines (Segala et al. 2017b; Serhan et al. 2020; Mouchel et al. 2020; Record et al. 2022). Toutefois, bien que le récepteur LXR $\beta$  ait été identifié comme responsable des effets supprimeurs tumoraux de la DDA (Voir section 5.4), les effets biologiques potentiels médiés par le récepteur LXR $\alpha$  restent encore à déterminer (Segala et al. 2017b). Une autre série de molécules naturelles mais qui ne sont pas des oxystérols, mais des sucres ont été décrits comme des ligands de faible affinité (mM) pour les LXRs, il s'agit du glucose et le glucose-6-

phosphate (mais pas les autres carbohydrates) (Mitro et al. 2007). Ces données sont cependant controversées et n'ont pas été confirmées (Shiota et Magnuson 2008; Denechaud et al. 2008; Patil et Kuehn 2024). D'autres séries de ligands d'origine microbienne tel que l'ergostérol (Taank et al. 2024) ou végétal tel que le stigmasterol (Yang et al. 2004), possédants tous les deux une ramification en C24, se sont révélés être des agonistes des LXRs (Figure 45). La diversité des ligands endogènes des LXRs continue de croître, illustrant la compréhension croissante des composés naturels et des métabolites régulant l'activité de ces récepteurs.

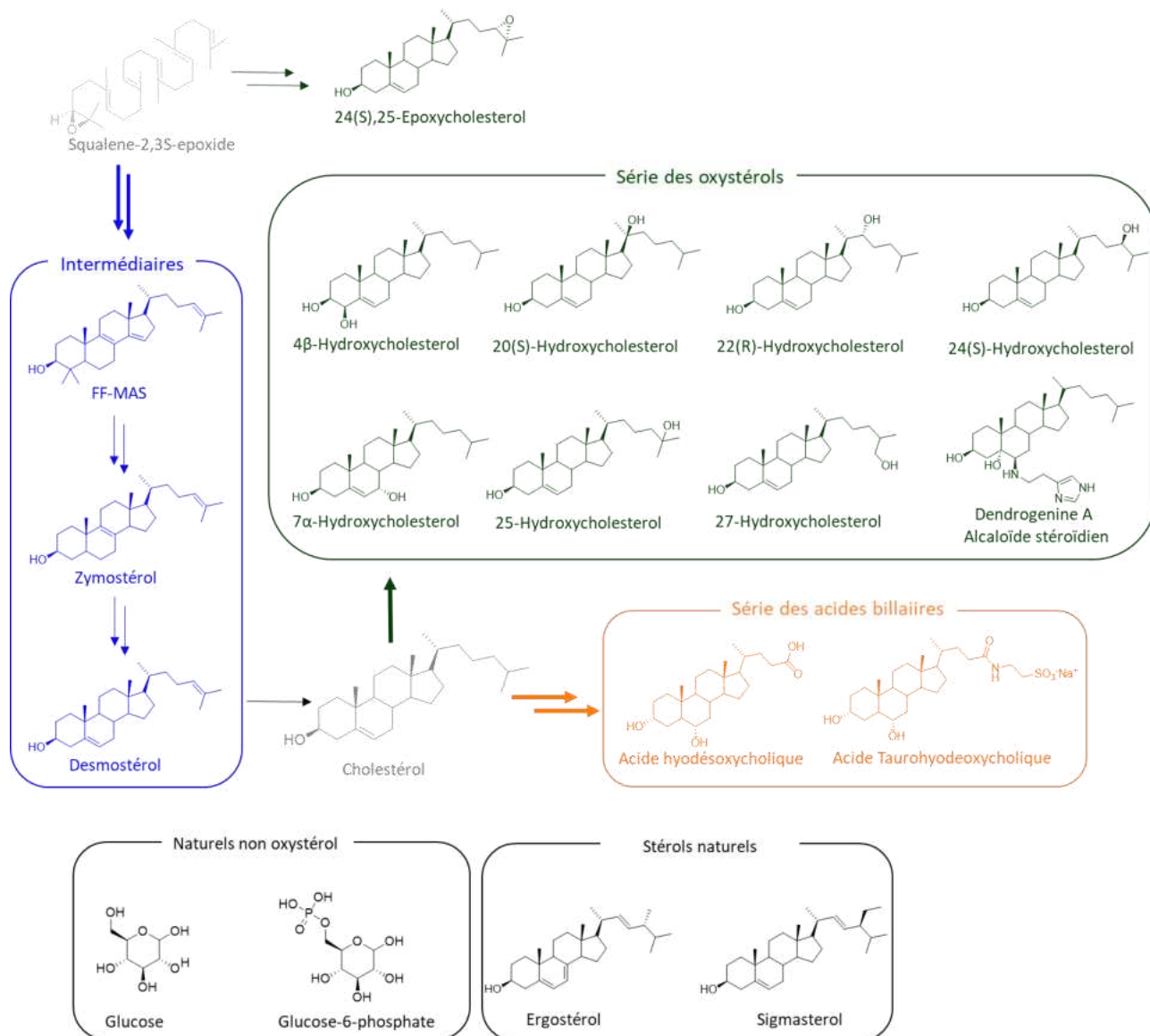


Figure 45 : Ligands agonistes endogènes décrits dans la littérature activant les LXRs.

Des antagonistes naturels des LXRs existent tels que certains oxystérols, des dérivés sulfatés d'oxystérols, et des PUFAs. Le stéréoisomère 22(S)-HC (oxystérol non-naturel de synthèse) présenterait une activité antagoniste des LXRs. Le 5,6α-EC a été identifié comme ligand et un modulateur des récepteurs LXRs avec une activité variant selon le type cellulaire étudié



(Berrodin et al. 2010). Les dérivés sulfatés naturels d'oxystérols, comme le cholestérol-5,6 $\alpha$ -époxyde-3 $\beta$ -sulfate (5,6 $\alpha$ -ECS), le 7-Céto-cholestérol-3-sulfate (7-KCS) agiraient comme des antagonistes potentiellement naturels des récepteurs LXRs (Song et al 2001). Dans cette étude le 5,6 $\beta$ -ECS et le 6-Céto-cholestérol-3-sulfate (6-KCS) étaient inactifs (Song et al 2001). Les oxystérols hydroxylés sur la chaîne latérale et sulfatés, notamment, le 24(S)-HC sous sa forme monosulfaté (24S-HCS) ou disulfaté (24S-HCdS) ainsi que le 25-Hydroxycholestérol-3-sulfate (25-HCS) (Ma et al. 2008) sont décrits comme des antagonistes naturels des LXRs. Certains composés naturels non oxystérols, tels que le géranylgéranyl pyrophosphate issu de la voie mévalonate (Gan et al. 2001), , ainsi que les PUFAs de la famille des  $\omega$ 3 et  $\omega$ 6, en particulier l'acide arachidonique C20:4  $\omega$ 6 (Ou et al. 2001) et son métabolite, la prostaglandine F2 $\alpha$  (Zhuang et al. 2013), agiraient comme antagonistes des LXRs (Figure 46).

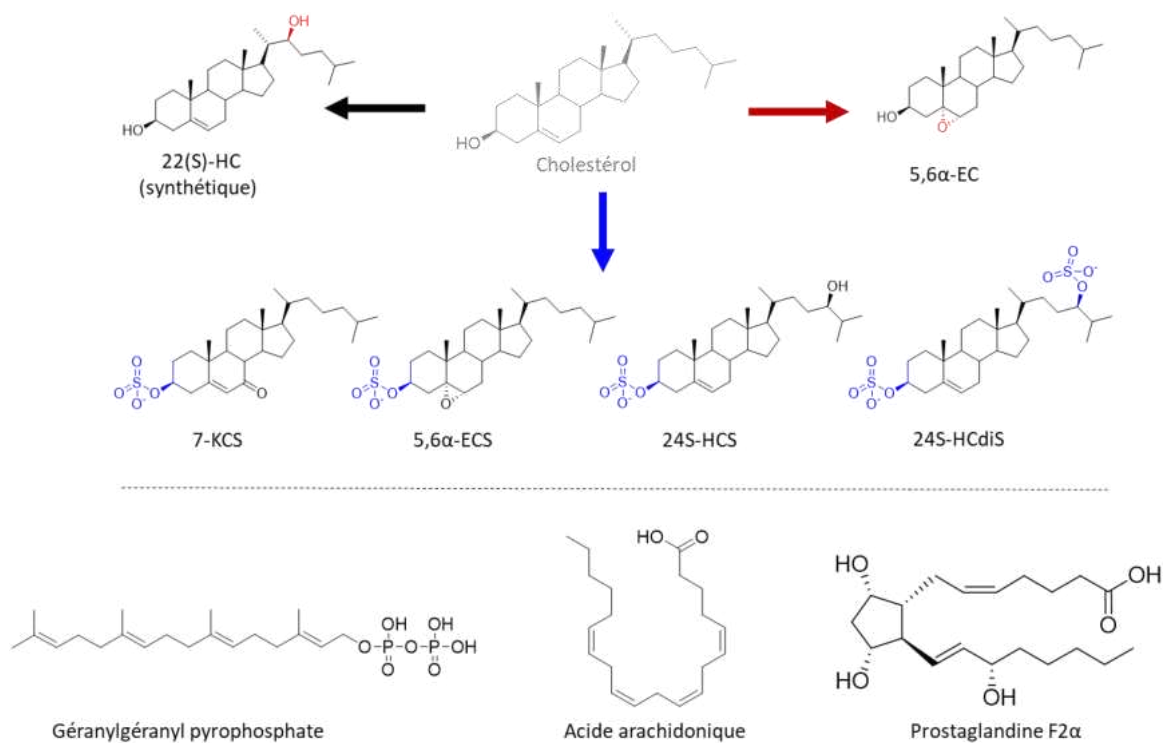


Figure 46: Ligands antagonistes endogènes décrits dans la littérature activant les LXRs.

### 3.3. Ligands exogènes des LXRs

Depuis que les récepteurs LXRs ont démontré leur importance dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol et leur effet hypocholestérolémiant, les compagnies pharmaceutiques ont été motivées à développer des agonistes synthétiques pour traiter plus particulièrement l'athérosclérose. Depuis lors, de nombreuses molécules ont été testées, ce qui a permis d'augmenter le nombre de candidats afin d'optimiser leur efficacité vis-à-vis des

récepteurs LXRs. Ces ligands synthétiques démontrent une affinité élevée pour ces, souvent de l'ordre de quelques nM. Parmi ces ligands synthétiques, le T0901317, se distingue comme un agoniste de première génération avec une haute affinité pour les récepteurs LXRs, de l'ordre de quelques nM ( $EC_{50} \sim 50$  nM, avec des valeurs de  $K_d$  de 7 nM pour le LXR $\alpha$  et de 22 nM pour le LXR- $\beta$ ) (Schultz et al. 2000). Cette molécule a été conçue par des études in silico et des synthèses chimiques à partir de son analogue chef de fil, identifié par un criblage de 300,000 molécules dans les années 2000, le T0314407 (Schultz et al. 2000). Cependant, son utilisation thérapeutique est limitée car il induit une lipogenèse hépatique, causant une stéatose hépatique et une hypertriglycémie. Car le T0901317 ne cible pas uniquement les récepteurs LXRs mais peut aussi activer d'autres récepteurs nucléaires, le récepteur des acides biliaires Farnésoïdes X (FXR ; NR1H4 avec un  $EC_{50} \sim 5$   $\mu$ M), un récepteur nucléaire impliqué dans la régulation du métabolisme des lipides et du glucose (Houck et al. 2004). Il active également le récepteur nucléaire Pregnane X (PXR; NR1I2) avec le même ordre d'affinité que pour les LXRs, entraînant une accumulation de lipides dans le foie (Mitro et al. 2007). Un autre agoniste, le LXR-623 de la série indazole, a été développé et a atteint la phase clinique I ([ClinicalTrials.gov; NCT00379860](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00379860)) (DiBlasio-Smith et al. 2008). Bien qu'il ait montré des effets anti-athérosclérotiques prometteurs, son développement clinique a été interrompu en raison d'effets secondaires sur le CNS (Quinet et al. 2009). Le GW3965, de la série acide amine tertiaire, est un agoniste LXR synthétique développé par GlaxoSmithKline (GSK) pour un potentiel traitement de la neuroinflammation et l'hypercholestérolémie (Collins et al. 2002). Son développement clinique a été entravé par des effets secondaires indésirables de stéatose hépatique et une hypertriglycémie. Son analogue, le GW6340, de la série des carboxamides cible spécifiquement les LXRs de l'intestin grêle sans affecter le foie, présentant ainsi un potentiel clinique pour le traitement de l'athérosclérose (Yasuda et al. 2010). GSK a développé plusieurs autres ligands de forte affinité pour les LXRs de l'ordre du nM, parmi lesquels le GSK3987 (Jaye et al. 2005), un agoniste LXR ( $EC_{50} \sim 40$  nM) de la série maleimide, et le GSK9772, un agoniste à haute affinité pour le LXR $\beta$  ( $EC_{50} \sim 30$  nM) de la série N-phenyl amine tertiaire, conçu en conservant le pharmacophore du T0901317, le groupement alcool bistrifluorométhylbenzyle (Chao et al. 2008). De plus, GSK a également développé un antagoniste à haute affinité pour le LXR $\beta$  ( $EC_{50} \sim 4$  nM), le GSK2033 de la série sulfamide tertiaire (Zuercher et al. 2010). Le T0901317 et le GW3965 sont actuellement les ligands synthétiques les plus utilisés dans les études fondamentales sur les LXRs. L'existence des

structures cristallographiques : du LXR $\beta$  co-cristallisé avec le TO901317 (PDB ID : [1UPV](#)) (Hoerer et al. 2003), du LXR $\alpha$  co-cristallisé avec le GW3965 (PDB ID : [3IPQ](#)) (Fradera et al. 2010), ainsi que du LXR $\beta$  co-cristallisé avec le 24(S),25-époxycholestérol (PDB ID : [1P8D](#)) (Williams et al. 2003), offrent une base structurelle précieuse pour la conception de nouveaux agonistes par docking moléculaire. À ce jour, aucun agoniste des récepteurs LXRs n'a été approuvé pour une utilisation clinique (Taank et al 2024). Cependant, le RGX-104 ([ClinicalTrials.gov; NCT02922764](#)), un agoniste synthétique des LXRs est en développement clinique pour évaluer son efficacité dans le traitement des cancers solides métastatiques et des lymphomes (Tavazoie et al. 2018) (Figure 47).

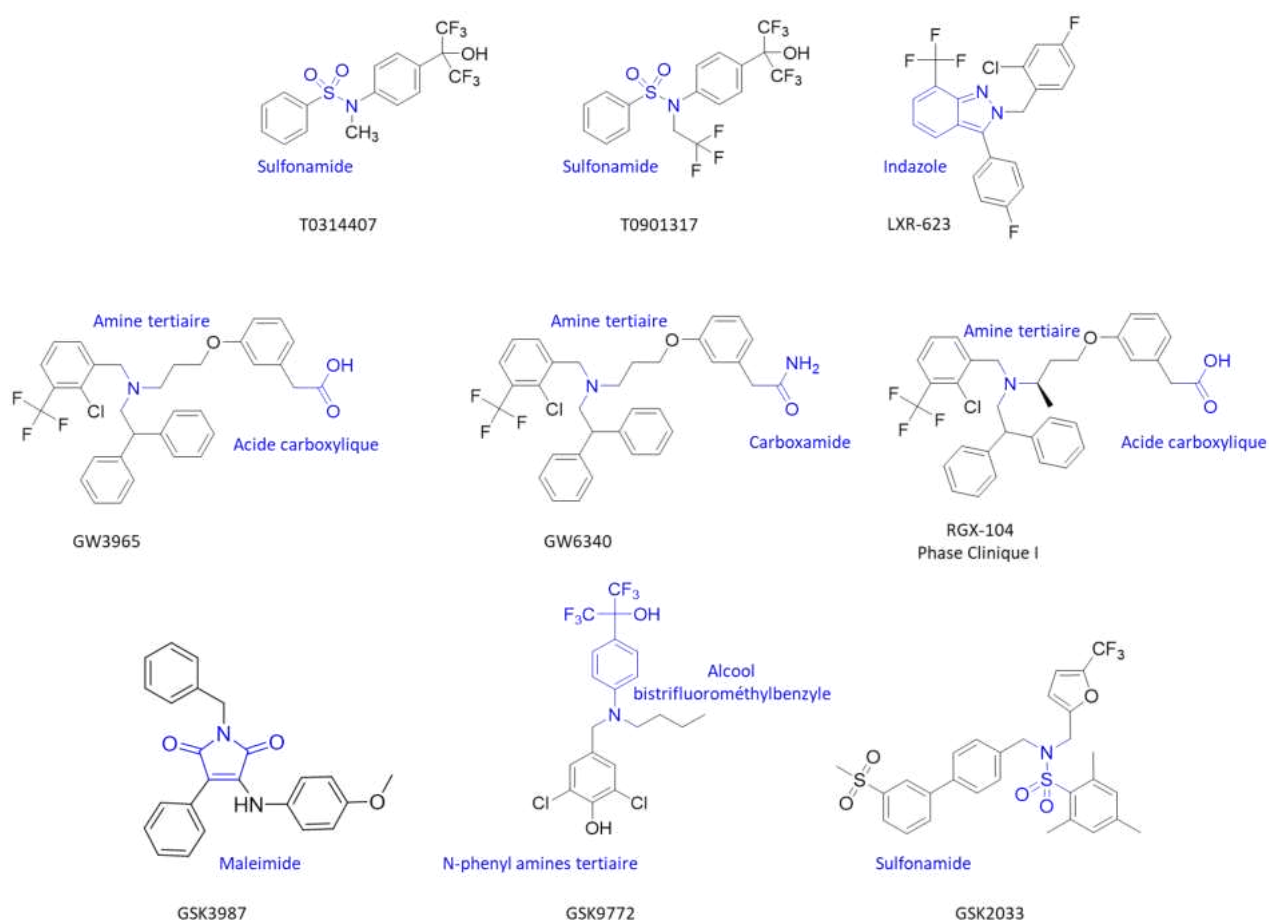


Figure 47: Ligands synthétiques des LXRs.

Dans cette partie de ma thèse concernant les LXRs, la représentation des ligands simplement autant qu'agonistes et/ou antagonistes est une façon de résumer l'avancée des travaux réalisés sur ce sujet mais il ressort que les capacités activatrices et inhibitrices des ligands varient selon plusieurs facteurs. Tels que, la séquence du LXRE, le contexte et l'équipement



cellulaire en cofacteurs et corépresseur exercent une influence forte sur les activités modulatrices des ligands. Ainsi l'étude menée par Albert et ses collègues a conduit les auteurs à proposer une classification des ligands en fonction de leurs propriétés de recrutement des cofacteurs. En plus des agonistes purs et des antagonistes purs, 4 catégories principales d'agonistes partiels ont été identifiés : (i) les activateurs compétitifs, permettant une induction complète simultanée du recrutement de co-activateurs et de corépresseurs ; (ii) les activateurs partiels, permettant une induction partielle du recrutement de co-activateurs sans liaison à un corépresseur ; (iii) les activateurs compétitifs partiels, permettant une induction partielle du recrutement à la fois de co-activateurs et de co-répresseurs ; (iv) les dérépresseurs, inhibant toute liaison avec un cofacteur (Albers et al. 2006). En complément de cette classification, la notion de modulateurs sélectifs des LXRs (SLiMs) a été introduite pour concevoir des molécules capables de cibler spécifiquement chaque isoforme de ces récepteurs et de cibler spécifiquement l'organe affecté. Cette approche vise également à assurer une biodisponibilité optimale tout en minimisant les effets secondaires indésirables (Viennois et al. 2012).

Les récepteurs nucléaires LXRs sont essentiels dans plusieurs processus biologiques. Leur rôle principal est de réguler l'homéostasie du cholestérol, la lipogenèse et la réponse inflammatoire. Une altération de l'activité des LXRs peut être associée à des dysfonctionnements métaboliques, contribuant à des maladies telles que le diabète, l'athérosclérose, les inflammations chroniques, divers cancers et des troubles neurologiques, y compris les maladies neurodégénératives (Buñay et al. 2021) (Figure 48).

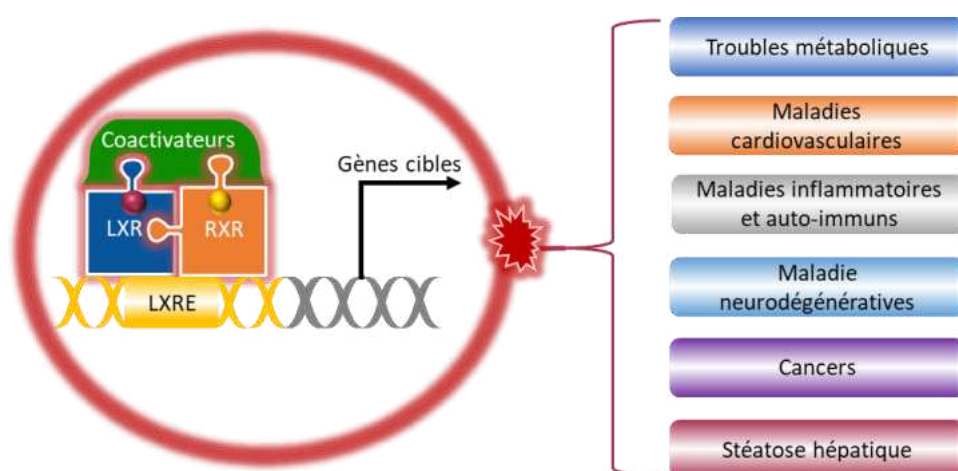


Figure 48: Implication des récepteurs LXRs dans de multiples pathologies.

### 3.4. Rôles biologiques des LXRs dans le transport et le métabolisme du cholestérol

#### a) Les LXRs dans l'excrétion hépatique du cholestérol

L'identification des oxystérols comme ligands endogènes des LXRs (Janowski et al. 1996) a fourni la première indication de leur rôle potentiel dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol (Lehmann et al. 1997). L'un des gènes cibles suspecté des LXRs est le *cyp7a*, qui code pour le CYP7A1, une enzyme clé et limitante dans la synthèse des acides biliaires. Cela est dû à la présence du LXRE identifié dans le promoteur du gène *cyp7a* chez le rat et la souris (Lehmann et al. 1997). Cette hypothèse a été confirmée par l'étude menée sur des souris déficientes en LXR $\alpha$  (Peet et al. 1998) qui accumulent des quantités importantes de cholestérol dans le foie en réponse à un régime riche en cholestérol. Ce phénomène est associé à une augmentation du volume du foie (hépatomégalie) et à des dommages sévères au niveau hépatique, dus à l'incapacité du foie à éliminer le cholestérol dans la bile et à le métaboliser en acides biliaires (Peet et al. 1998). Cependant, les souris déficientes en LXR $\beta$  présentent un métabolisme du cholestérol normal et peuvent s'adapter à un excès de cholestérol dans leur alimentation (S. Alberti et al. 2001). Ces études suggèrent que le LXR $\alpha$  parvient à compenser une perte du LXR $\beta$  mais pas l'inverse. Cependant, le LXR $\beta$  semble compenser mais pas suffisamment la perte du LXR $\alpha$  car les souris doublement déficientes en LXR $\beta$  et LXR $\alpha$  présentent un phénotype hépatique plus grave par rapport aux souris avec seulement LXR $\alpha$  nul (Repa et al. 2000). À la différence des rats et des souris, les LXRs ne régulent pas l'expression du gène *CYP7A1* humain, car ce dernier ne possède pas de sites LXRE sur son promoteur. En conséquence, son expression n'est pas augmentée par les agonistes des récepteurs LXRs (Chiang et al 2001b; Goodwin et al. 2003). Cette variation entre espèces contribue, au moins en partie, à la plus grande sensibilité des humains à l'hypercholestérolémie induite par une alimentation riche en cholestérol par rapport aux rongeurs (Chiang et al. 2001b). En effet, chez les souris transgéniques exprimant le CYP7A1 humain, le gène n'est pas activé par une alimentation riche en cholestérol, ce qui rend ces animaux plus susceptibles de développer une hypercholestérolémie dans de telles conditions (J. Y. Chen et al. 2002).

## b) Les LXRs dans le Transport Inverse du Cholestérol (TIC)

L'activation de LXR induit également la transcription de différents gènes impliqués dans le processus de transport inverse du cholestérol (TIC), favorisant son retour des tissus périphériques vers le foie en vue de son excrétion. Les protéines de transport membranaire de la famille des ABC : ABCA1, ABCG1, ABCG5 et ABCG8 (Joyce J. Repa et Mangelsdorf 2002) jouent un rôle crucial dans ce processus et sont étroitement régulés par les LXRs. Dans les premières étapes de l'efflux de cholestérol des cellules périphériques comme les macrophages, ABCA1, une protéine de la membrane plasmique, facilite le transfert du cholestérol vers les apolipoprotéines extracellulaires telles que l'apoA1, essentielles pour la formation des HDLs (Venkateswaran et al. 2000). De même, ABCG1, localisée principalement sur les membranes intracellulaires, favorise le transfert du cholestérol vers les HDL (Kennedy et al. 2005). Le transport du cholestérol médié par ABCA1 est d'une importance cruciale car les mutations sur le gène ABCA1 chez l'homme conduisent à la maladie de Tangier (appellation faisant référence à l'île de Tangier où les premiers cas sont apparus) (Rust et al. 1999), un trouble caractérisé par une réduction sévère des niveaux de HDL et ApoA1 dans le plasma ainsi qu'une accumulation accrue de cholestérol dans les tissus périphériques, pouvant entraîner une athérosclérose précoce chez les personnes atteintes (Hoffman et Fredrickson 1965). Les LXRs activent directement l'expression de l'ADP-Ribosylation Factor-Like 7 (ARL7 ; également connue sous le nom d'ARL4C) (Hong et al. 2011), impliquée dans le transport du cholestérol entre le compartiment périnucléaire et la membrane plasmique, facilite ainsi l'efflux de cholestérol médié par ABCA1 (Engel et al. 2004). De plus, les LXRs induisent l'expression d'apolipoprotéines telles que ApoA1 et ApoE, permettant la formation de particules de HDL (Laffitte et al. 2001). Une fois formées ces particules HDL peuvent subir des modifications de leur composition grâce à des protéines de remodelage, dont l'expression est régulée par les LXRs. Ces protéines incluent la protéine de transfert de phospholipides (PLTP, facilitant le transfert de phospholipides et de cholestérol entre les lipoprotéines, favorisant la structure et la fonction des HDL (Laffitte et al. 2003), la protéine de transfert d'esters de cholestérol (CETP, médiant l'échange d'esters de cholestérol entre les lipoprotéines, influençant la taille et la composition des HDL et autres lipoprotéines) (Y. Luo et Tall 2000), ainsi que la lipase des lipoprotéines (LPL, hydrolysant les triglycérides des lipoprotéines, modifiant ainsi leur composition et contribuant au métabolisme des lipides) (Y. Zhang et al.

2001). Par ailleurs, les transporteurs ABCG5 et ABCG8 facilitent l'élimination du cholestérol du foie vers l'intestin (Graf et al. 2003) *via* le transporteur NPC1L1 (Niemann-Pick disease C1-like 1) (Altmann et al. 2004). L'activation des LXRs par des agonistes stimule également ces transporteurs dans le foie, renforçant ainsi l'excrétion biliaire des stérols (Yu et al. 2003). Un processus crucial, car les mutations des gènes ABCG5 et ABCG8 entraînent la sitostérolémie, une maladie génétique autosomique récessive caractérisée par une accumulation excessive de phytostérols et de cholestérol dans le sang, pouvant être liée à une athérosclérose prématurée (Berge et al. 2000). Le traitement repose principalement sur l'ézétimibe ([Ezétrol®](#)), qui inhibe la protéine de transport NPC1L1 impliquée dans l'absorption intestinale des (phyto)stérols, réduisant ainsi significativement leurs concentrations plasmatiques (Garcia-Calvo et al. 2005; Stellaard et al. 2017). Les LXRs jouent aussi un rôle dans la régulation du trafic intracellulaire du cholestérol en contrôlant l'expression des transporteurs de cholestérol NPC1 et NPC2 (Rigamonti et al. 2005).

### c) Les LXRs dans la biosynthèse du cholestérol

Ils interviennent également dans le contrôle de la biosynthèse du cholestérol et sont étroitement liés à l'activité de SREBP-2. Alors que les LXRs favorisent l'efflux du cholestérol, les protéines SREBP-2 stimulent sa biosynthèse et son absorption lorsque les niveaux cellulaires sont bas, selon le mécanisme décrit (voir section 1.5). Les LXRs contrôlent également l'expression de SREBP-2 et des enzymes cholestérogéniques qui en dépendent. Dans l'étude menée par Peet et ses collègues, les souris invalidées pour LXR $\alpha$  montrent une surexpression hépatique de SREBP-2 ainsi que de plusieurs de ses gènes cibles, comme le HMGCR et le HMGCS et le farnésyl diphosphate indépendamment de SCAP et INSIG, avec un effet similaire mais plus faible observé chez les souris invalidées pour le LXR $\beta$  (Alberti et al. 2001). En accord avec ces résultats, l'étude menée par Wang et ses collègues, a montré que le LXR $\alpha$  inhibe sélectivement l'expression de deux gènes impliquée dans la biosynthèse du cholestérol, la squalène synthase (FDFT1) et la lanostérol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) en se liant directement à l'élément de réponse spécifique nLXRE (negative LXRE), co-réprimant ainsi leur expression (Wang et al. 2008). De plus, plusieurs études ont démontré que l'activité de SREBP-2 par son interaction avec la séquence SRE du promoteur (Brown 2012), ainsi que l'activité tissulaire spécifique des LXRs (Yongjun et al. 2008; X. Fu et Wang 2024), sont liées à

la régulation de la DHCR24, influençant ainsi les intermédiaires du cholestérol, et par conséquent son expression. Cependant, il est à noter que la forte expression des enzymes de synthèse du cholestérol dans le foie de souris invalidée pour le LXR $\alpha$  n'a pas conduit à l'augmentation de la synthèse du cholestérol (Peet et al. 1998; Alberti et al. 2001). De plus, des études ont révélé des différences des effets médiés par les agonistes synthétiques non-stéroïdiens et les agonistes stéroïdiens sur la biosynthèse du cholestérol. Par exemple, le 22(R)-HC et le 24(S),25-HC semblent maintenir la biosynthèse du cholestérol à des niveaux constants en inhibant probablement le clivage de SREBP2 via leur accumulation, le T0901317 et le GW3965 augmentent sa biosynthèse (Aravindhan et al. 2006) même si ces derniers semblaient par leur effet agoniste sur les LXRs conduire à une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol dans une autre étude (Schultz et al. 2000) menée sur le même modèle. Dans un mécanisme de régulation inverse, les LXRs modulent l'absorption du cholestérol par les LDLR, qui sont eux-mêmes sous la régulation de SREBP-2 (Hua et al. 1993), en régulant l'expression d'IDOL (Inducible Degradation Of LDLR), une E3 ubiquitine ligase qui induit la dégradation lysosomale du LDLR (Van Loonet al. 2019). L'activation des LXRs entraîne une réduction du nombre des LDLRs présents à la surface des cellules en augmentant l'expression et l'activité d'IDOL, ce qui favorise la dégradation des LDLRs (Zelcer et al. 2009) (Figure 49).

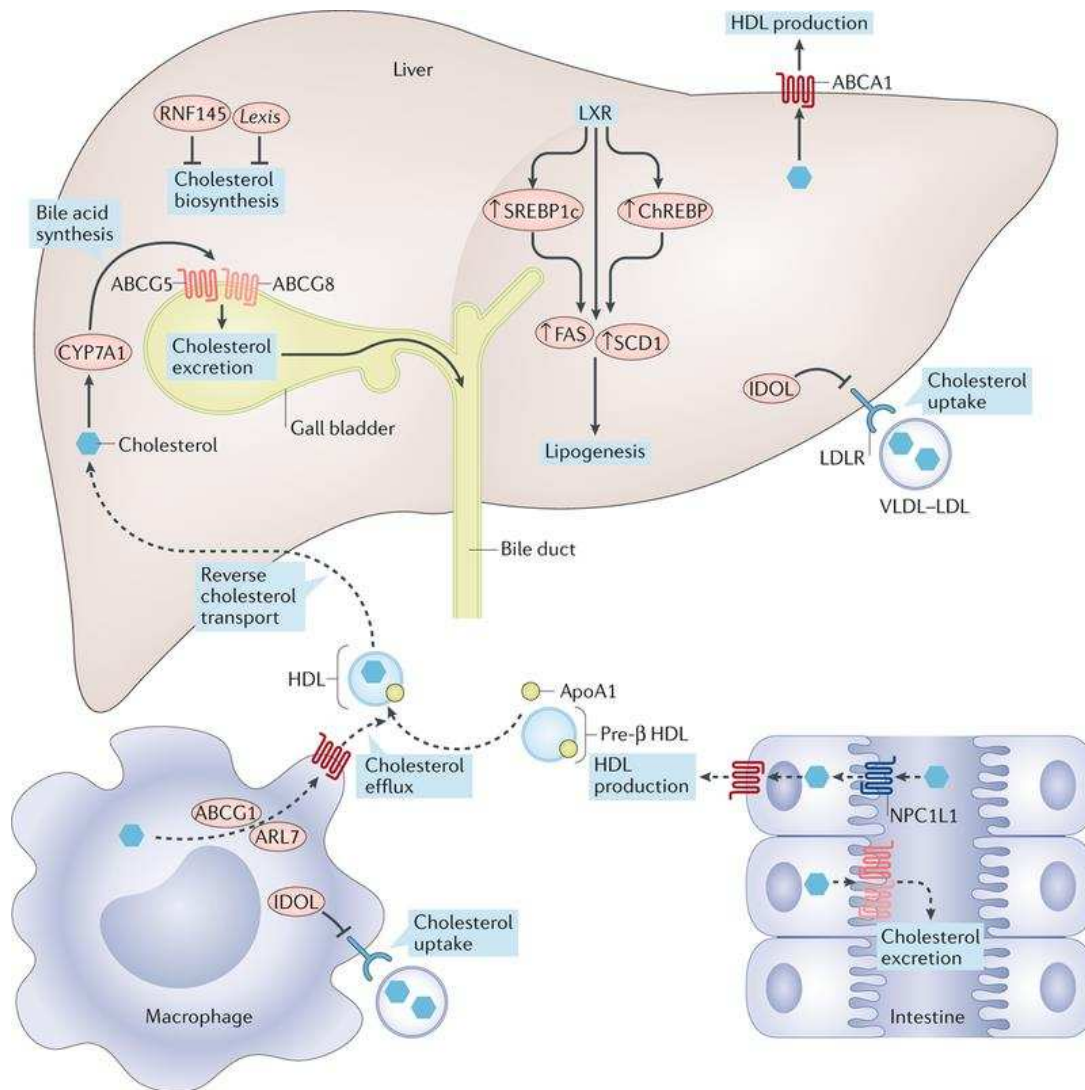


Figure 49 : Les LXRs dans le métabolisme des lipides et du cholestérol, en mettant en avant l'implication des LXRs dans l'excrétion hépatique du cholestérol, dans le Transport Inverse du Cholestérol (TIC) et dans la biosynthèse du cholestérol. Illustration tirée sans apporter de modification à partir de la revue de Tontonoz 2018 (B. Wang et Tontonoz 2018)

## 4. Métabolites secondaires du cholestérol

Ces oxystérols peuvent subir des modifications chimiques supplémentaires faisant intervenir encore une fois les CYPs ou des hydroxystéroïde déshydrogénases (HSD), ou des conjugaisons par des sulfotransférases (SULT2) ou des acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT1/ SOAT1, ACAT2/ SOAT2 et LCAT, formant ainsi des métabolites secondaires du cholestérol.

### 4.1. Les oxystérols poly-oxygénés

Les oxystérols poly-oxygénés sont des formes spécifiques d'oxystérols qui contiennent plusieurs groupes oxygénés sur leur structure. En raison de la présence d'un groupe hydroxyle en position  $3\beta$  et en position C25 ou C27 (Yantsevich et al. 2014), l'enzyme CYP7B1 peut agir sur le 25-HC et le 27-HC pour produire respectivement le  $7\alpha,25$ -diHydroxycholestérol ( $7\alpha,25$ -DHC) et le  $7\alpha,27$ -diHydroxycholestérol ( $7\alpha,27$ -DHC), des métabolites dans la voie acide des AB en vue de leur élimination (Toll et al. 1994; Schwarz et al. 1997). Et via une 24-hydroxycholestérol  $7\alpha$ -hydrolase spécifique au 24S-HC, le CYP39A1 principalement exprimé dans le foie et impliqué dans la conversion du 24-HC en  $7\alpha,24$ -diHydroxycholestérol ( $7\alpha,24$ -DHC) pour son excrétion en AB (Li-Hawkins et al. 2000; Norlin et al. 2000) (Figure 50). Contrairement à la CH25H, le CYP7B1 est largement exprimé dans le foie et la thyroïde, mais comme la CH25H, il est également stimulé par le LPS (Preuss et al. 2014) ce qui s'accompagne d'une augmentation de 7 fois de la production du  $7\alpha,25$ -DHC chez la souris, par exemple (C. Liu et al. 2011). En 2011, deux groupes de chercheurs (Hannedouche et al. 2011; C. Liu et al. 2011) ont simultanément identifié le  $7\alpha,25$ -DHC comme ligand naturel de haute affinité au récepteur couplé à la protéine G 183 (GPR183) également connu sous le nom de gène induit par le virus Epstein-Barr 2 (EBI2). En se liant à l'EBI2, le  $7\alpha,25$ -DHC régule la migration des lymphocytes B, qui sont des cellules immunes, soulignant ainsi son rôle clé dans les processus immunitaires et inflammatoires (Clottu et al. 2017; Hannedouche et al. 2011; C. Liu et al. 2011). Dans ce contexte, la notion de structure-activité est d'une grande importance. Les études menées en analysant différents analogues du  $7\alpha,25$ -DHC par des tests enzymatiques (C. Liu et al. 2011) et docking moléculaire (Bened-Jensen et al. 2012) dans le site catalytique de l'EBI2 ont démontré que les trois groupes hydroxyles en positions  $3\beta$ ,  $7\alpha$  et 25 sont indispensables pour la liaison et l'activation optimale du récepteur. De plus, la configuration axiale  $\alpha$  de l'hydroxyle en position C7 $\alpha$  est préférable à la position équatoriale  $\beta$ , et



l'hydroxylation en position C25 est privilégiée. Cependant, une hydroxylation en position C27 entraîne également une activation significative de l'EBI2, concluant que le 7 $\alpha$ ,25-DHC et le 7 $\alpha$ ,27-DHC sont identifiés comme des ligands endogènes potentiels de l'EBI2 (7 $\alpha$ ,25-DHC >>>7 $\alpha$ ,27-DHC) (C. Liu et al. 2011; Benned-Jensen et al. 2012). Les mutations dans le gène CYP7B1 conduit à la paraplégie spastique héréditaire (PSH) type 5 (SPG5) (Schöls et al. 2017), également connue sous le nom de maladie de Strümpell-Lorrain et est caractérisée par une faiblesse et une raideur progressives des muscles des membres inférieurs (Tsaousidou et al. 2008). Les patients atteints de cette mutation présentent des niveaux élevés de 25-HC et 27-HC dans le sérum en raison de la diminution de l'activité du CYP7B1 (Schüle et al. 2010). En raison de la présence du groupement 7 $\alpha$ -hydroxy et 3 $\beta$ -hydroxy, l'enzyme 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 7 (HSD3B7, C<sub>27</sub> 3 $\beta$ -HSD), largement exprimée dans le foie (Schwarz et al. 2000), catalyse la conversion oxydative du 7 $\alpha$ ,24S-DHC, 7 $\alpha$ ,25-DHC et 7 $\alpha$ ,27-DHC formés sous leurs formes 3-oxo-4-ènes : le 7 $\alpha$ ,24(S)-diHydroxycholestenone (7 $\alpha$ ,24S-diHCO) le 7 $\alpha$ ,25-diHydroxycholestenone (7 $\alpha$ ,25-diHCO) et le 7 $\alpha$ ,27-diHydroxycholestenone (7 $\alpha$ ,27-diHCO), respectivement (Griffiths et Wang 2020) (Figure 50). Cette enzyme transfère la double liaison du cycle B de la position C5-C6 vers le cycle A à la position C4-C5 et oxyde le groupement Hydroxyle en position C3 $\beta$  en cétone. Ces modifications structurales, conduisant à la perte du groupement hydroxyle en position C3 $\beta$ , sont suffisantes pour empêcher la liaison du ligand 7 $\alpha$ ,25-diHCO à l'EBI2 (Yi et al. 2012).



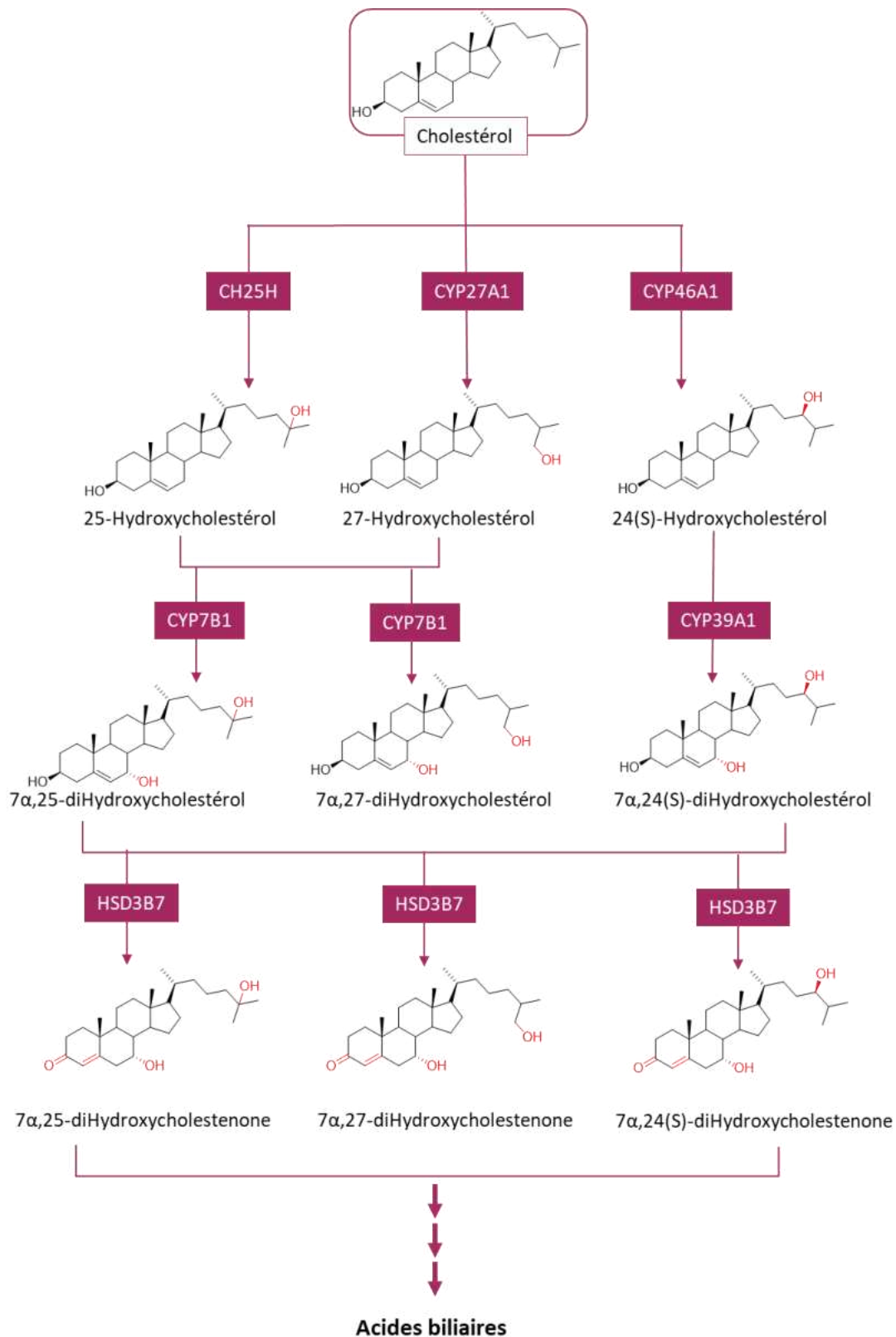


Figure 50: Les voies alternatives des acides biliaires impliquent la conversion du cholestérol en oxystérols par diverses enzymes (CYP27A1, CH25H, CYP46A1), suivie de la 7 $\alpha$ -hydroxylation dans le foie par l'oxystérol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7B1 ou CYP39A1) et l'oxydation par la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (HSD3B7)

D'une autre part, le CYP27A1 est considéré comme une enzyme ayant un large spectre de substrat. En 1973, Björkhem et Gustafsson dans leur étude dans la caractérisation de l'enzyme, ont montré que les substrats polaires étaient hydroxylés en position C27 plus efficacement que leurs analogues moins polaires (Björkhem et Gustafsson 1973). Par exemple, le cholestérol est hydroxylé plus efficacement que le cholestérol oléate, mais moins efficacement que le cholestérol sulfate. Le 7 $\alpha$ -HC est hydroxylé en position C27 de manière plus efficace que le cholestérol et cette efficacité augmente encore avec l'ajout d'un troisième groupe hydroxyle (5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -triol). Les stéroïdes avec une structure 3-oxo- $\Delta$ 4 sont hydroxylés en position C27 beaucoup plus efficacement que les stéroïdes 3 $\beta$ -OH- $\Delta$ 5 correspondants. Par exemple, le cholesténone est hydroxylé 10 fois plus efficacement que le cholestérol, et le 7 $\alpha$ -HC-4-cholestène-3-one s'est révélé être un substrat plus efficace que le cholestérol 7 $\alpha$ -HC (Björkhem et Gustafsson 1973; Norlin et al. 2003). L'épimère, 7 $\beta$ -HC est également substrat du CYP27A1 et de la CH25H conduisant à la formation respective du 7 $\beta$ -27HC et du 7 $\beta$ -25HC (Beck, Inderbinen, et al. 2019; Beck, Kanagaratnam, et al. 2019). Le 7-KC, un oxystérol oxydé au niveau du cycle B du noyau stéroïdien, est également un substrat du CYP27A1 et de la CH25H. Ces enzymes l'hydroxylent respectivement en position C27 et C25, formant ainsi le 7-Céto-27-Hydroxycholestérol (7KC-27HC) et le 7-Céto-25-Hydroxycholestérol (7KC-25HC), soutenant une voie de détoxification pour le 7-KC (Beck, Kanagaratnam, et al. 2019; Beck, Inderbinen, et al. 2019; Heo et al. 2011a). Beck et ses collègues ont également montré une implication des enzymes de type 11 $\beta$ -HSD dans la réduction stéréospécifique respective du 7KC-25HC et du 7KC-27HC en 7 $\beta$ -25HC et 7 $\beta$ -27HC par la 11 $\beta$ -HSD1 et du 7 $\beta$ -25HC et du 7 $\beta$ -27HC en 7KC-25HC et 7KC-27HC, respectivement, par la 11 $\beta$ -HSD2 (Figure 51).

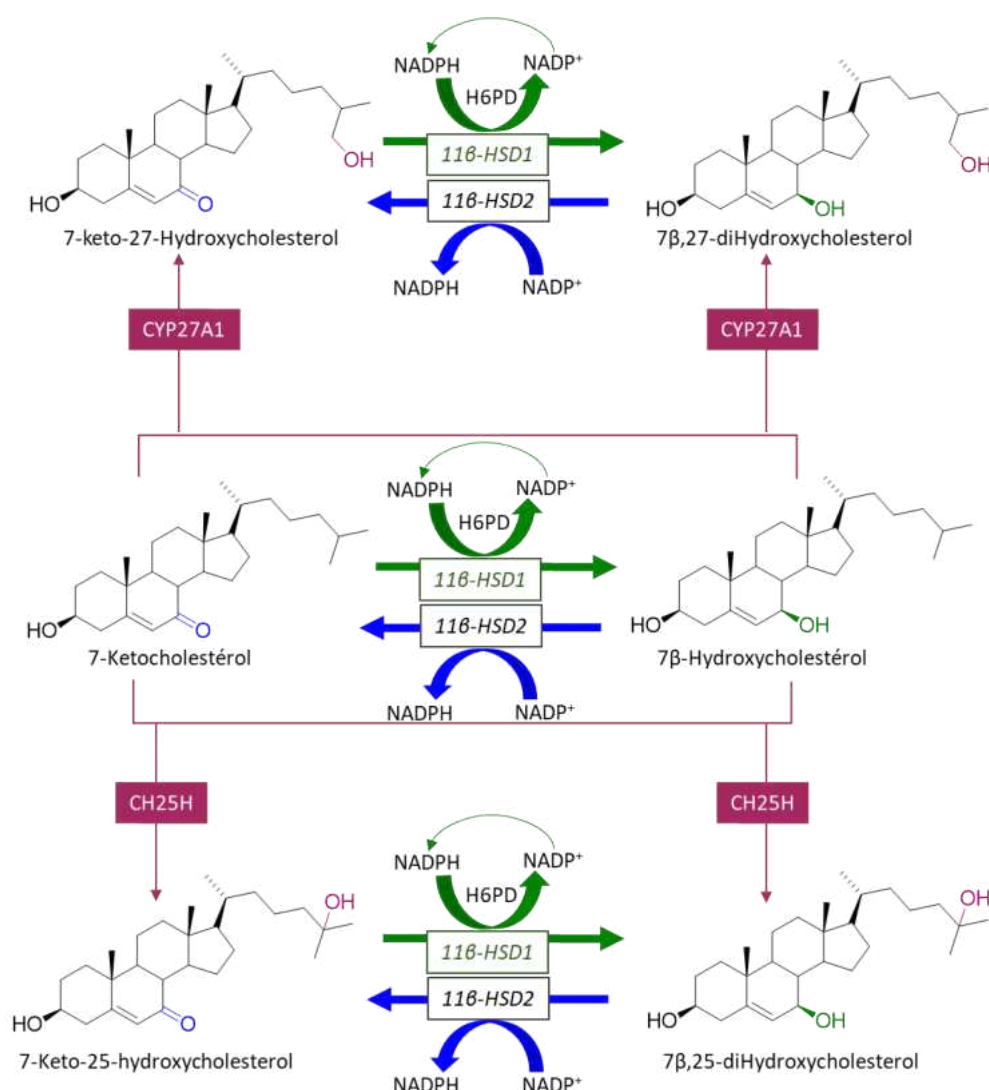


Figure 51 : Schéma indiquant la formation des oxystérols poly-oxygénés en position C7/C25 et C7/C27 impliquant la CH25H et le CYP27A1 ainsi que les enzymes 11β-HSD1 et 11β-HSD2 dans leur formation.

Le 4β-HC, un oxystérol oxydé au niveau du cycle A du noyau stéroïdien peut aussi subir une hydroxylation au niveau de la chaîne latérale en position C27 ou C25 par le CYP27A1 et la CH25H, produisant respectivement les 4β,27-diHydroxycholestérol (4β,27-DHC) et 4β,25-diHydroxycholestérol (4β,25-DHC). Ces métabolites du 4β-HC ont été détectés *in vivo* et *in vitro* pour la première fois par l'équipe de Muccoili (Roumain et al. 2023). De plus, leur étude montre que les formes 25-HC et 27-HC peuvent servir de substrat pour le CYP3A4, formant respectivement les 4β,25-DHC et 4β,27-DHC (Roumain et al. 2023) (Figure 52). Ce large spectre de substrats que le CYP27A1 pourrait catalyser suggère que d'autres oxystérols comme les 5,6-ECs, le CT et l'OCDO pourraient également subir une hydroxylation en position C27 par

cette enzyme. Ceci pourrait conduire à de nouveaux métabolites dont l'activité dépendra probablement de leurs structures.

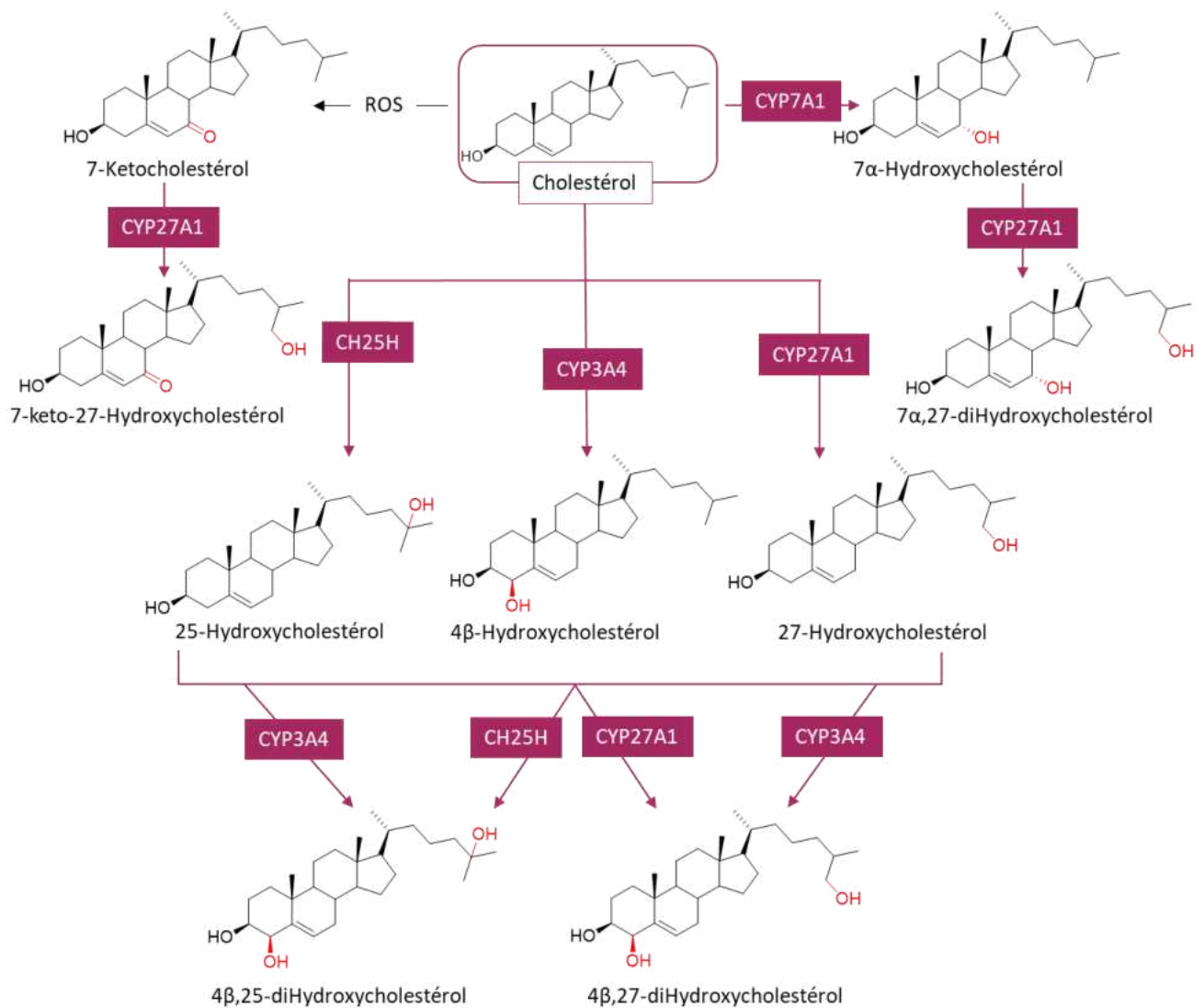


Figure 52 : Formation d'oxystérols poly-oxygénés, en position C4/C25 et C4/C27 impliquant respectivement, le CYP3A4/CH25H et le CYP3A4/CYP27A1, avec une large diversité de substrats pour le CYP27A1.

## 4.2. Les oxystérols sulfatés

La sulfatation constitue une autre voie de régulation du métabolisme du cholestérol. Le cholestérol et les oxystérols peuvent subir une « sulfatation » en position 3 $\beta$ -hydroxy du cycle A du noyau stéroïdien, conduisant aux oxystérols 3-sulfate (OXS) (Fuda et al. 2007). La sulfonation implique le transfert d'un groupe sulfonate ( $\text{SO}_3^{1-}$ ), tandis que la sulfatation implique le transfert d'un groupe sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). Par conséquent, les produits de la sulfonation devraient être correctement désignés comme des sulfonates. Cependant, en raison du fait que le transfert du groupe  $\text{SO}_3^{1-}$  à l'hydroxyle crée un motif  $\text{SO}_4$ , les molécules sulfonées ont été appelées « sulfates », une dénomination largement utilisée dans la littérature (Schuler 2021). L'enzyme responsable de cette sulfoconjugaison appartient à une superfamille de sulfotransférases cytosoliques (SULTs). Ces enzymes catalysent le transfert du groupement  $\text{SO}_3^{1-}$  depuis un composé donneur, le 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS), vers l'hydroxyle accepteur, avec la libération du produit sulfaté et du PAPS désulfoné (PAP) (Figure 53) (C. N. Falany 1997). La superfamille des SULT comprend 5 familles, dont une SULT2 associée à la sulfatation des oxystérols. La famille SULT2 est divisée en 2 sous-familles, SULT2A1 et SULT2B1, présentant une similarité d'identité d'environ 37 % dans leur séquence d'acides aminés, et sont codées par les gènes *SULT2A1* et *SULT2B1*, respectivement (Strott et Higashi 2003). Le gène *SULT2B1* code pour deux isoformes, la SULT2B1a et la SULT2B1b, qui diffèrent uniquement au niveau de leur extrémité N-terminale (Her et al. 1998). La première enzyme humaine identifiée comme ayant une activité cholestérol sulfotransférase était la SULT2A1 (Aksoy et al. 1993) mais par la suite il a été montré que l'isoenzyme SULT2B1b sulfate le cholestérol avec une plus grande efficacité que la SULT2A1 (Norman B. Javitt et al. 2001) et que l'isoforme SULT2B1a n'a aucune affinité pour le cholestérol mais favorise plutôt la prégnénolone comme substrat (Fuda et al. 2002). Le cholestérol sulfonate (CHS) isolé pour la première fois en 1964 (Drayer et al. 1964) et retrouvé à des concentrations plasmatiques d'environ  $2.6 \pm 0.6 \mu\text{mol/l}$  dans les conditions normales (Prah et al. 2019). De nombreux oxystérols hydroxylés sur la chaîne latérale peuvent être transformés en oxystérols sulfates, tels que le 24-Hydroxycholestérol 3-sulfate (24-HCS), le 25-Hydroxycholestérol 3-sulfate (25-HCS) et le 27-Hydroxycholestérol 3-sulfate (27-HCS). Ces oxystérols sulfates peuvent subir une sulfatation supplémentaire par la SULT2A1 au niveau du groupe hydroxyle de la chaîne latérale conduisant aux oxystérols disulfates (Sanchez et al. 2021). Parmi eux, le 25-HCS et le 25-Hydroxycholestérol-3,25-disulfate (25-HCdiS) ont été étudiés plus en profondeur, et leurs

activités biologiques ont été caractérisées. Ils ont montré ayant une activité inhibitrice de l'expression des gènes cibles des récepteurs LXRs impliqués dans la biosynthèse du cholestérol et la lipogenèse, ainsi que de posséder des propriétés anti-inflammatoires (Ren et al. 2007; 2014). Actuellement, le 25-HCS est en phase II d'essais cliniques pour évaluer son potentiel dans le traitement des maladies hépatiques, tel que la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD), menée par la société Durect Corporation sous le nom de Larsucosterol, DUR-928 ([ClinicalTrials.gov; NCT03917407](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03917407)). La sulfatation joue également un rôle majeur dans le métabolisme des oxystérols considérés comme cytotoxiques. Des études ont montré que les cellules exprimant la SULT2B1b, sont plus résistantes à la toxicité du 7-KC que celles ne l'exprimant pas. De plus, la surexpression de la SULT2B1b dans ces cellules favorise la conversion du 7-KC en 7-KCS, réduisant ainsi sa toxicité (Fuda et al. 2007).

Parmi les oxystérols issus de l'oxydation du noyau stéroïdien, les formes 5,6-epoxycholestanol ont également été identifiées comme substrats de la SULT2B1b (Fuda et al. 2007; Segala et al. 2013), avec le stéréoisomère 5,6 $\alpha$ -EC étant meilleur substrat, conduisant à la formation du 5,6 $\alpha$ -ECS (Fuda et al. 2007). Il a été montré que l'accumulation du 5,6 $\alpha$ -EC induit à la fois la mort et la re-différenciation des cellules cancéreuses mammaires *in vitro*, dépendant de la présence de la SULT2B1 et de son produit de sulfatation, le 5,6-ECS, ainsi que de l'activation des récepteurs LXRs (Segala et al. 2013). Classifiant ainsi le 5,6 $\alpha$ -ECS plutôt comme un modulateur des LXRs (Segala et al. 2013) et non pas un antagoniste pur comme proposé par Song et al (Song et al. 2001). Étant donné que des oxystérols hydroxylés au niveau du noyau B sont des substrats de cette enzyme (Fuda et al. 2007), le CT issu de l'hydrolyse des 5,6-ECs par la ChEH peut subir une sulfatation par la SULT2B1b, conduisant à la formation du cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -O-sulfate (CDS). Ce métabolite a été identifié dans les cellules cancéreuses mammaires exprimant l'enzyme, mais son impact n'a pas été évalué en raison de son hydrolyse par la stéroïde sulfatase (STS; EC 3.1.6.2) dans ces cellules (Segala et al. 2013), une enzyme présente de manière ubiquitaire dans les [tissus humains](#) (Warren et French 1965).

La STS est codée par le gène *STS* (Yen et al. 1988) et catalyse la conversion des stéroïdes sulfatés en stéroïdes libres (Reed et al. 2005), jouant un rôle essentiel dans la production et la régulation des hormones stéroïdiennes spécifiques aux tissus (Mueller et al. 2015). Par conséquent, des niveaux élevés de sulfates d'oxystérols ont été observés dans le sérum des patients présentant une déficience en STS (Sánchez-Guijo et al. 2015) conduisant à la maladie

rare d'ichtyose récessive liée à l'*X* (Wren et Davies 2024). L'activité de la STS varie au cours de la puberté, montrant des différences entre les sexes et atteignant son pic chez les jeunes filles avant la puberté (Trent 2013). De plus, l'activité de la STS est souvent augmentée dans divers tissus cancéreux par rapport aux tissus normaux (Stanway et al. 2007), y compris dans les cancers mammaires hormono-dépendants (Utsumi et al. 2000; Selcer et al. 2007). L'expression de la STS ne permet donc pas d'étudier efficacement les effets biologiques des stéroïdes monosulfatés en raison de leur hydrolyse rapide par cette enzyme (I. T. Cook et al. 2009), ceci est accompagné d'une augmentation de la production de ces stéroïdes sous forme libre et active (Falany et al. 2007). Cependant, certains dérivés sulfatés de médicaments hormonaux sont résistants à l'action de la STS. Par exemple, le **3 $\alpha$** -sulfate du tibolone résiste à la STS, tandis que le **3 $\beta$** -sulfate du tibolone est hydrolysé. De même, le benzothiophène sulfate du raloxifène est sensible à l'hydrolyse par la STS, tandis que la forme phénolique sulfate du raloxifène est résistante (Falany et al. 2007). Ces observations montrent que la synthèse de dérivés résistants à l'activité enzymatique de la STS constitue une stratégie pour contourner cette limitation biologique, tel que le remplacement du groupement sulfonate par un groupement sulfate, une approche chimiquement possible (El-Abid et al. 2024).

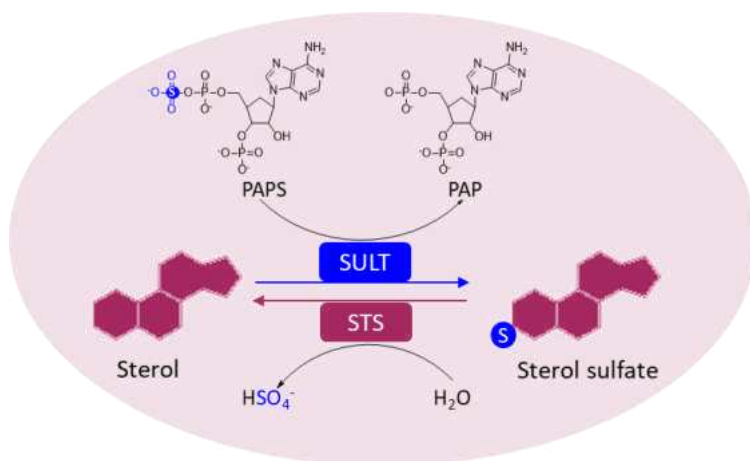


Figure 53 : Schéma illustrant les réactions catalysées par les SULTs et les sulfatases avec le PAPS comme co-substrat. SULT désigne la sulfotransférase, STS désigne la stéroïde sulfatase; PAPS correspond à la 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate; et PAP à la 3'-phosphoadénosine 5'-phosphate.



## 5. Métabolisme des 5,6-ECs

La présence du groupement  $3\beta$ -OH au niveau du cycle A et l'époxyde dans le cycle B de la structure des diastéréoisomères des 5,6-ECs entraîne leur métabolisme par des voies distinctes. Les 5,6-ECs peuvent être estérifiés avec des acides gras sous forme d'acétyl-coenzyme A par les enzymes ACAT1/SOAT1 et ACAT2/SOAT2 dans les cellules (C. Chang et al. 2006) ou par la LCAT dans le plasma humain (Pincinato, Moriel, et Abdalla 2009), formant les 5,6-EC- $3\beta$ -esters d'acides gras. Ils peuvent également être sulfatés par l'enzyme SULT2B1b en 5,6-ECS, comme mentionné précédemment (Fuda et al. 2007; Segala et al. 2013). Alternativement, la ChEH intervient au niveau de l'époxyde en C5-C6 des 5,6-ECs, catalysant leur hydratation stéréosélective en CT, avec le 5,6 $\beta$ -EC étant un substrat plus efficace que le 5,6 $\alpha$ -EC (Voisin et al. 2017; Philippe De Medina et al. 2010a). Le CT peut ensuite être oxydé par la 11 $\beta$ -HSD2 en OCDO (Voisin et al. 2017). Par ailleurs, seul le 5,6 $\alpha$ -EC peut servir de précurseur de la DDA et de son régioisomère le C17, par conjugaison enzymatique avec l'histamine au niveau de la liaison en C5-C6, respectivement via son amine primaire et son amine secondaire de l'anneau imidazole. Dans la série des Dendrogénine, le 5,6 $\alpha$ -EC est également précurseur de la dendrogénine B (DDB) par conjugaison avec l'amine primaire de la spermidine. L'enzyme responsable d'une telle conjugaison entre le 5,6 $\alpha$ -EC et ces amines biogènes n'a pas encore été identifiée. La littérature indique aussi que seul le 5,6 $\alpha$ -EC peut être conjugué au glutathion, formant le  $3\beta,5\alpha$ -dihydroxycholestane-6 $\beta$ -yl-S-glutathion, que nous désignerons DDC (Figure 54). Cette réaction d'addition stéréospécifique de l'anion sulfhydryle du glutathion à la position 6 $\beta$  du 5,6 $\alpha$ -EC est catalysée par une glutathion S-transférase cytosolique du foie de rat de type alpha 1 (rGSTA1) (Watabe et al. 1979; Meyer et Ketterer 1982; Tsikas 2022). Ces données mettent ainsi en évidence l'existence d'une enzyme potentiellement impliquée dans les réactions de conjugaison du 5,6 $\alpha$ -EC avec d'autres nucléophiles biogènes que le glutathion.

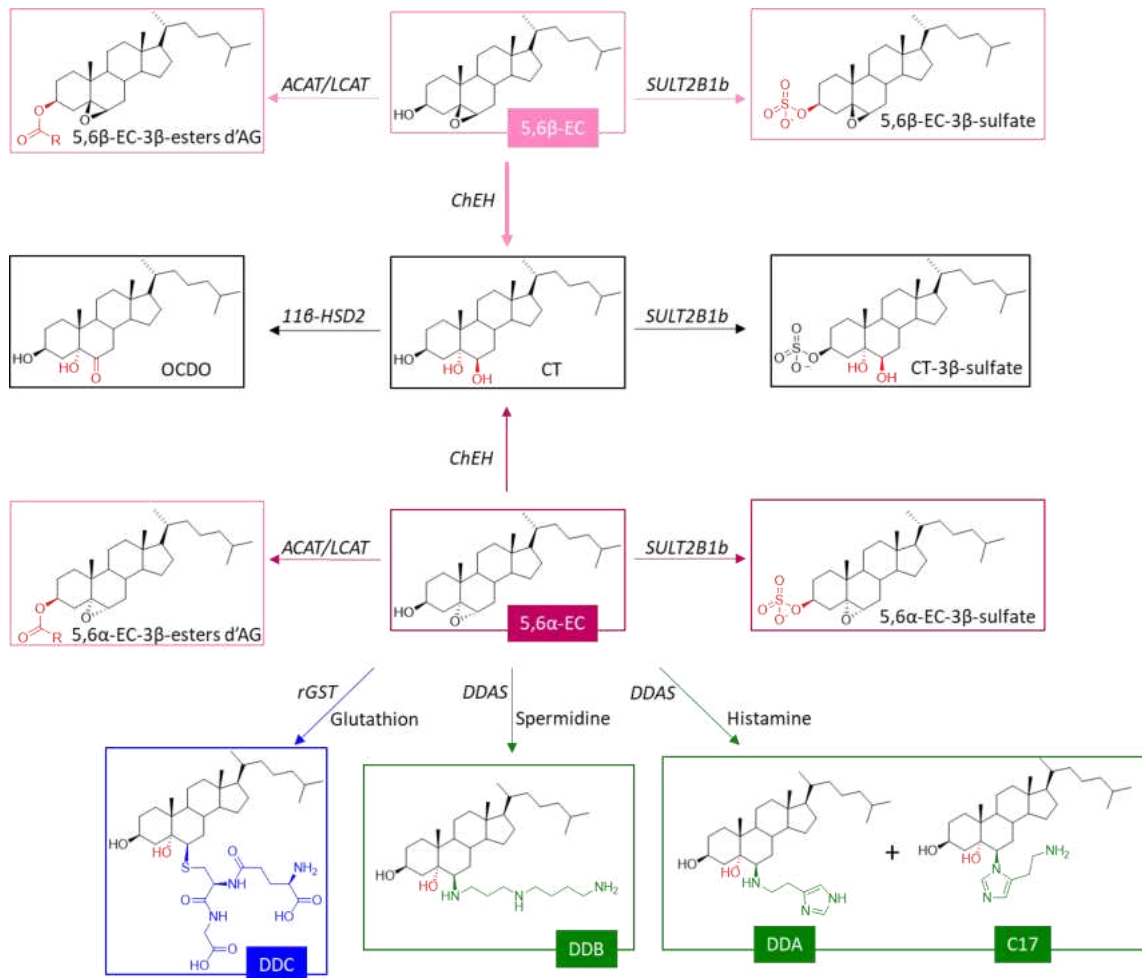


Figure 54 : Voies métaboliques des diastéréoisomères 5,6-ECs : estérification par l'ACAT et la LCAT, sulfatation par la SULT2B1b, hydratation par la ChEH et conjugaison spécifique avec les amines ou le glutathion par la DDAS et par la rGSTA1, respectivement.

### 5.1. La Cholestérol Époxyde Hydrolase : ChEH

Les époxydes hydrolases (EHs) sont une famille d'enzymes qui catalysent la conversion des lipides époxydés en ajoutant une molécule d'eau, ce qui ouvre le cycle époxyde et produit les *trans*-diols correspondants (Decker et al. 2009). Dans leur site catalytique, les résidus d'acide glutamique, d'acide aspartique et d'histidine jouent un rôle crucial (Müller et al. 1997). La première étape du mécanisme est une attaque nucléophile du résidu d'acide aspartique sur le cycle époxyde, formant une liaison covalente entre l'enzyme et le substrat époxyde à l'état de transition (Armstrong et al. 1980). Ensuite, le groupement carbonyle de l'intermédiaire ester est hydrolysé par une molécule d'eau activée. L'histidine agit comme une base générale en captant un proton de la molécule d'eau, ce qui augmente sa réactivité nucléophile sans la formation d'ions hydroxyde libres. L'histidine est alors stabilisée par des résidus d'acide glutamique ou d'acide aspartique proches (DuBois et al. 1978). Cette attaque hydrolytique casse la liaison ester, produisant les diols vicinaux correspondants et régénérant ainsi l'enzyme (Figure 55). Une telle modification augmente la solubilité des produits dans l'eau et modifie leur activité biologique (Seidegard et Ekstr 1997).

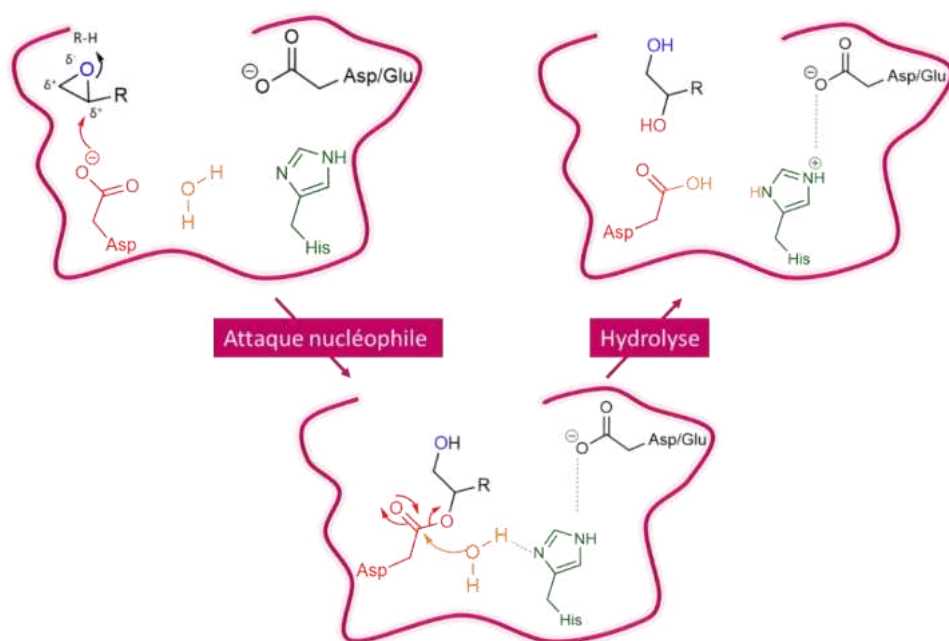


Figure 55 Mécanisme enzymatique de l'hydrolyse des époxydes par les époxydes hydrolases (EHs), adaptée de (Müller et al. 1997).

Actuellement, cinq époxydes hydrolases ont été identifiés : l'époxyde hydrolase soluble (sEH), l'époxyde hydrolase microsomale (mEH), l'hépoiline hydrolase, l'hydrolase du leukotriène A4 (LTA4) et l'époxyde hydrolase du cholestérol (ChEH) (Newman et al. 2005).

L'hydrolyse enzymatique du cholestérol-5,6-époxyde a été décrite dans les années 1970 (Aringer et Eneroth 1974), mais ce n'est que dans les années 1980 que la ChEH (EC 3.3.2.11) a été reconnue comme étant une époxyde hydrolase spécifique pour les époxydes 5,6-ECs (Oesch et al. 1984). En effet, la ChEH est extrêmement sélective pour les diastéréoisomères 5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ -EC, catalysant leur hydratation stéréosélective en cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT) (Sevanian et McLeod 1986; T Watabe et Sawahata 1979; Silvente-Poirot et Poirot 2012a), avec le 5,6 $\beta$ -EC étant un substrat plus efficace que le 5,6 $\alpha$ -EC (Voisin et al. 2017; Philippe De Medina et al. 2010a). La ChEH est localisée dans le réticulum endoplasmique et est largement exprimée dans divers tissus chez les mammifères, tels que le foie, les reins, les poumons, les testicules, la rate, le cerveau, l'épithélium intestinal, la peau et d'autres organes (Silvente-Poirot et Poirot 2012a), avec une activité ChEH environ cinq fois plus élevée dans le foie par rapport aux organes extra-hépatiques (Aström et al. 1986). En 2010, l'étude menée par mon équipe d'accueil a révélé que l'activité de la ChEH est portée par le site de liaison microsomale des anti-oestrogènes (AEBS).

### 5.1.1. ChEH et AEBS: THE PERFECT MATCH

AEBS a été identifié pour la première fois par Robert Sutherland et Jean-Charles Faye dans les années 1980 (Sutherland et al. 1980; Faye et al. 1980). Ce site est caractérisé par une affinité élevée (nM) pour le Tam du même ordre que celle qu'il présente pour le ER $\alpha$  (Watts et al. 1984). AEBS se distingue du ER $\alpha$  car le Tam, mais pas le 17 $\beta$ -estradiol, se lie à AEBS, d'où son appellation « anti-oestrogen binding site » (Sutherland et al. 1980). Depuis cette découverte, divers analogues du Tam ont été développés, incluant des ligands synthétiques de haute affinité pour AEBS, principalement dérivés de la série des diphénylméthanés (DPM). Parmi ces ligands, le DPPE (N,N-diéthyl-2-[4-(phénylméthyl)phénoxy]-éthanamine), aussi connu sous le nom de Tescmilifène, a été d'abord développé par Brandes (Brandes 1984), et le PBPE (N-Pyrrolidino-2-(4-benzyl-phénoxy)-éthanamine) a été élaboré plus tard par Poirot (Poirot et al. 2000) (Figure 56). Ces composés se lient spécifiquement à AEBS avec une grande affinité, sans

interagir avec les ER, et ont permis d'établir par la suite la contribution du site AEBS dans la pharmacologie anticancéreuse du Tam (Leignadier et al. 2017) .

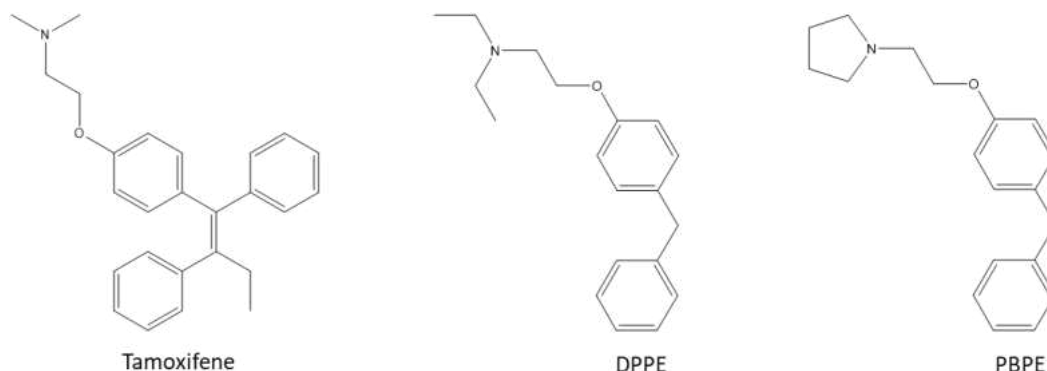


Figure 56: Structure des ligands d'AEBS. Le Tamoxifène fait partie des SERMs, le PBPE et le DPPE sont des ligands sélectifs de synthèse.

En parallèle, plusieurs équipes de recherche ont tenté d'identifier des ligands endogènes pour AEBS en recherchant des composés endogènes capables d'inhiber la liaison du Tam à ce site. L'analyse des lipides présents dans le sérum a révélé que celui-ci contient au moins deux grandes catégories de composés endogènes capables d'interagir avec AEBS à des concentrations physiologiques : certains oxystérols tels que le 4-Cholesten-3-one et le 7-KC (Murphy et al. 1985) ainsi que des acides gras insaturés (P. L. H. Hwang 1986; 1987). Des études ont également suggéré que AEBS pourrait servir de site de liaison pour l'histamine et aux antihistaminiques (Brandes et al. 1985; Brandes et Bogdanovic 1986b). Cette observation n'est pas négligeable, car elle a conduit aux recherches actuelles menées par mon équipe d'accueil conduisant à la découverte de la DDA. En se basant sur l'identification des oxystérols comme ligands endogènes d'AEBS, des études de structure-affinité ont été menées sur divers stérols (P. L. Hwang et Matin 1989). Les composés qui inhibent la liaison du 7-KC ou du Tam à l'AEBS se classent selon leur affinité dans l'ordre suivant : 7-Céto-cholestanol > 6-Céto-cholestanol > 7-KC = 7 $\beta$ -HC > CT = 7 $\alpha$ -HC > 4-Cholesten-3-one (P. Hwang 1990) . En revanche les oxystérols hydroxylés au niveau de la chaîne latérale ont montré une affinité faible ou négligeable pour AEBS (P. L. Hwang et Matin 1989; P. Hwang 1990). Plus tard, les 5,6-ECs ont été ajoutés à cette liste, ayant été identifiés comme des ligands de haute affinité pour AEBS par notre équipe (Philippe De Medina et al. 2010a). Notre équipe a également montré qu'AEBS est un site constitué d'un complexe hétéro-oligomérique composé en partie par une stéroïde-

isomérase (EBP ou D8D7I) et d'une stéroïde-réductase (DHCR7) (Kedjouar et al. 2004; Philippe De Medina et al. 2024), deux enzymes impliquées dans la biosynthèse post lanostérol du cholestérol (voir section 1.1.II) (Figure 57). Il a été démontré que la co-expression de ces deux enzymes est essentielle pour reconstruire le site de haute affinité microsomal du Tam, c'est-à-dire AEBS (Kedjouar et al. 2004). Il a été observé que le site AEBS et la ChEH partagent de nombreuses caractéristiques pharmacologiques : tous deux sont microsomaux, et les oxystérols connus comme substrats de la ChEH (5,6-ECs) ou comme inhibiteurs (7-KC, 7-Céto-cholestanol et 6-Céto-cholestanol) (Sevanian et McLeod 1986; T Watabe et Sawahata 1979; Silvente-Poirot et Poirot 2012a) ont également été identifiés comme ligands de AEBS (P. Hwang 1990; Philippe De Medina et al. 2010b). De plus, tous les ligands d'AEBS testés (39 au total) ont été reconnus comme inhibiteurs de la ChEH (Philippe De Medina et al. 2010a). De la même manière que pour AEBS, la co-expression de l'EBP et la DHCR7 a conduit à une augmentation marquée de l'activité de la ChEH, contrairement à l'expression individuelle de chacune des deux enzymes, qui n'a entraîné qu'une augmentation modérée de l'activité enzymatique. En effet, l'EBP et la DHCR7 influencent les paramètres cinétiques de la ChEH de manière différente. L'extinction de l'EBP a significativement diminué le  $V_{max}$  de l'enzyme pour l'hydrolyse des 5,6-ECs, tandis que l'absence de DHCR7 a augmenté le  $K_m$  indiquant que la DHCR7 joue un rôle régulateur en modifiant l'affinité et en facilitant la liaison des substrats. Ces résultats ont permis d'établir que au niveau moléculaire, la ChEH est identique à l'AEBS et que son activité est portée par AEBS (Philippe De Medina et al. 2010a). Le traitement avec le Tam et d'autres inhibiteurs de la ChEH/AEBS induisent la différenciation cellulaire et l'apoptose des cellules de cancer du sein ER $\alpha$ + et ER $\alpha$ -, à des concentrations qui inhibent la ChEH. Ces traitements entraînent également l'accumulation de stérols et de 5,6-ECs, en conséquence de la stimulation de la lipoperoxydation et l'inhibition de la ChEH, bloquant la conversion des 5,6-ECs en CT dans les cellules cancéreuses par ces traitements (Payré et al. 2008; P De Medina et al. 2009; Philippe De Medina, Silvente-Poirot, et Poirot 2009a) (Figure 57). Cependant, les 5,6-ECs n'induisent pas de différenciation de ces cellules (Philippe De Medina et al. 2009), ce qui a conduit l'équipe à suggérer leur transformation en une autre classe de molécules ayant une activité de redifférenciation. Les études menées par mon laboratoire d'accueil sur leur transformation ont révélé l'implication des 5,6-ECs dans une voie métabolique associée au développement du cancer du sein.

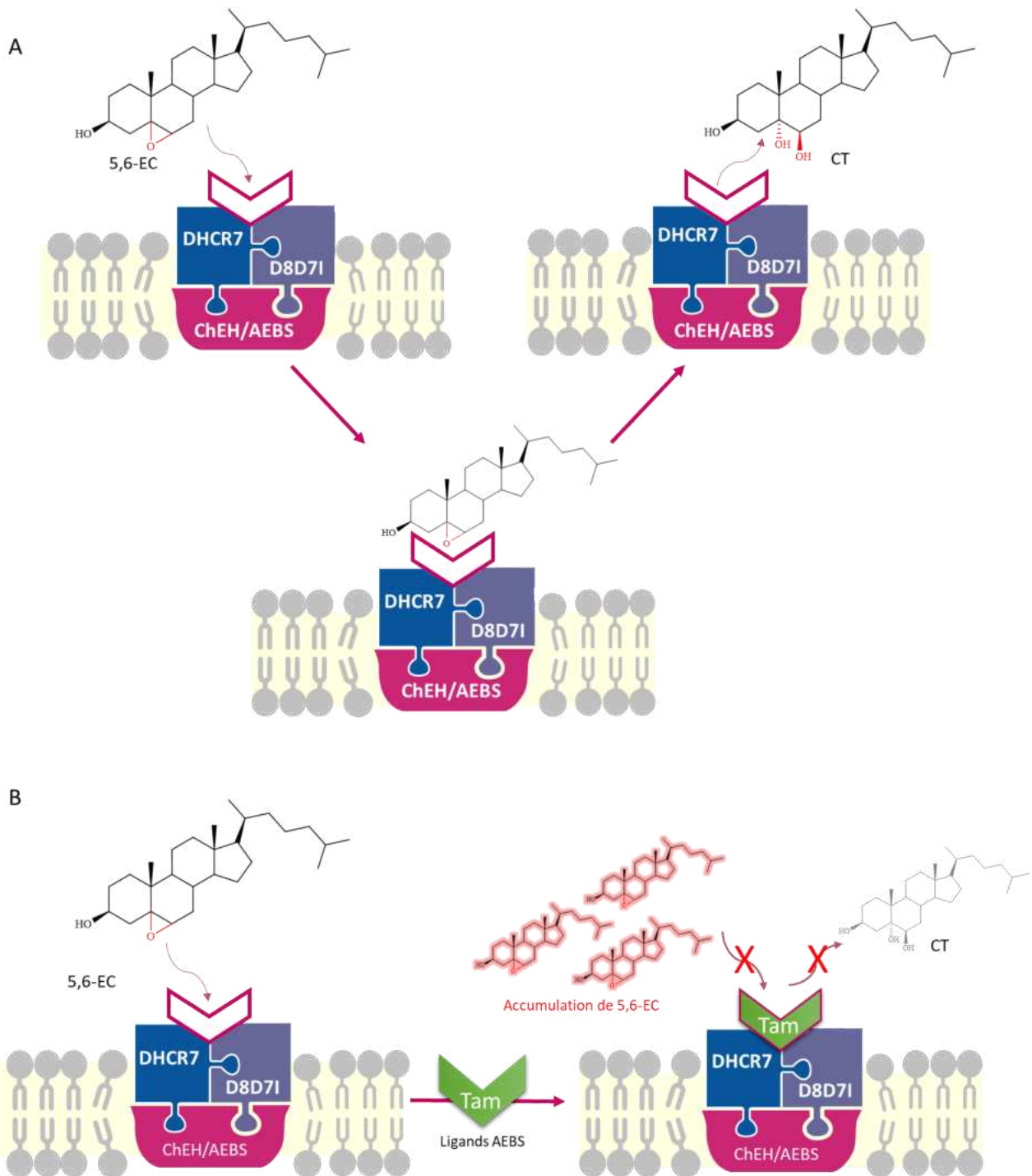


Figure 57 : A : L'activité de la Cholestérol-5,6-epoxide hydrolase (ChEH) est portée par l'AEBS formé par les enzymes EBP (D8D7I) et DHCR7 et assurant l'hydratation des 5,6-époxycholestanoles (5,6-ECs) en cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT). B: Les ligands d'AEBS sont des inhibiteurs de la ChEH, entraînant l'accumulation des 5,6-ECs.



## 5.2. Cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT)

Le CT, métabolite issu par hydrolyse de ses précurseurs obligatoires, le 5,6 $\alpha$ -EC et le 5,6 $\beta$ -EC (Sevanian et McLeod 1986; T Watabe et Sawahata 1979; Philippe De Medina et al. 2010a), est l'un des oxystérols les plus abondants retrouvé dans le plasma ( $\approx 1.42$  ng/ml) (Brown et Jessup 1999; Helmschrodt et al. 2013). Les études menées sur les propriétés biologiques du CT révèlent qu'il peut induire des effets à la fois bénéfiques et délétères (Figure 58). Par exemple, une exposition prolongée *in vitro* et *in vivo* à des concentrations élevées de CT a mis en évidence son potentiel effet pro-athérogène (R. P. Cook et MacDougall 1968; Matthias et al. 1987). Il a été observé que le CT favorise la calcification des cellules musculaires lisses vasculaires (H. Liu et al. 2004). De plus, le CT inhibe la différenciation ostéogénique et favorise l'apoptose des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse chez le rat (H. Liu et al. 2005) et induit la mort cellulaire des cellules souches mésenchymateuses dérivées des adipocytes (Silva et al. 2017). D'autre part, il a été démontré que le CT exerce des effets positifs en inhibant la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de la prostate, par un mécanisme impliquant le LXR $\alpha$  (C.-Y. Lin et al. 2013). De plus, il a été montré récemment que le CT stimule la génération de ROS tant au niveau intracellulaire que mitochondrial dans les cellules cancéreuses du poumon, ce qui active le stress du réticulum endoplasmique et l'autophagie, conduisant ainsi à la mort cellulaire (J. Chen et al. 2024). Dans le cerveau, le CT est l'un des principaux oxystérols et a démontré un effet neuro-protecteur tant *in vivo* qu'*in vitro*. Cet effet repose sur la diminution de l'activité des récepteurs glutamatergiques NMDA (N-méthyl-D-aspartate), provoquée par l'excès de glutamate, en réduisant l'entrée de calcium (Ca<sup>2+</sup>) dans les neurones, ce qui contribue à prévenir les dommages causés par une activation excessive de ces récepteurs (Hu et al. 2014). Des niveaux élevés de CT peuvent être caractéristiques de situations pathologiques. Ceci est le cas de la maladie de Niemann–Pick de type C (NPC) (F. D. Porter et al. 2010).

La maladie de Niemann Pick de type C (NPC, MIM#257220) est une maladie neurodégénérative rare progressive causée par des mutations du gène *NPC1* dans 95 % des cas et du gène *NPC2* dans 5 % des cas (Stern et al. 2024). Ces gènes codent respectivement pour les protéines lysosomales NPC1 et NPC2, qui sont essentielles pour le transport intracellulaire du cholestérol (J. Luo et al. 2017) (voir section 1.6). Les mutations dans ces gènes perturbent ainsi

ce processus, entraînant une accumulation lysosomale et endosomale de cholestérol non estérifié, une caractéristique clé de NPC, ainsi que de glyco- et sphingo-lipides dans divers tissus (Sleat et al. 2004). Cette accumulation affecte principalement le système nerveux central mais aussi les tissus extra-neuronaux, provoquant divers symptômes cliniques tels que des troubles neurologiques, hépatiques et dermatologiques, dus au dépôt et à la surcharge lipidique. Actuellement, le médicament Miglustat (Zavesca®) est utilisé en France pour le traitement de NPC. Il est approuvé pour cette indication en Europe, mais il ne l'est pas aux États-Unis par exemple. L'identification et la validation de biomarqueurs est primordiale afin de suivre l'évolution clinique et l'efficacité des essais cliniques des traitements proposés (Stern et al. 2024). Dans la recherche de biomarqueurs, des études *in vivo* et *in vitro* ont suggéré que l'accumulation de lipides dans les lysosomes, caractéristique de la maladie de NPC, s'accompagne d'un stress oxydatif cellulaire, montrant une élévation de la concentration de ROS et de peroxydation lipidique (Reddy, Ganley, et Pfeffer 2006; Zampieri et al. 2009), conduisant à la formation d'oxystérols (Tint et al. 1998). Parmi ces oxystérols, la concentration du CT a été retrouvée spécifiquement élevée. Porter et ses collègues ont étudié les concentrations du CT dans un modèle murin, un modèle félin et chez l'homme (F. D. Porter et al. 2010). Ils ont trouvé des concentrations élevées de CT dans le plasma, le foie et le cerveau du modèle murin de NPC. En revanche, les concentrations étaient plus faibles chez les félins traités avec un dérivé de cyclodextrine. Chez les patients atteints de NPC, une augmentation des concentrations plasmatiques de CT d'un facteur 10 a été observée, variant de 89 à 328 ng/ml, et corrélée à la gravité de la maladie (F. D. Porter et al. 2010). Cette corrélation positive entre le profil de CT et la sévérité clinique de la maladie a été confirmée dans l'étude Pajares (Pajares et al. 2015). De plus, l'étude de Cooper et ses collègues ont montré que les patients diagnostiqués avant l'âge de deux ans avaient les formes les plus sévères avec des concentrations plasmatiques de CT significativement plus élevées (449,0 ng/ml) par rapport à ceux diagnostiqués plus tard (89,3 ng/ml) (Cooper et al. 2020). Ces résultats suggèrent que le CT pourrait servir de biomarqueur afin d'évaluer la réponse aux traitements et surveiller la progression ou la gravité de la maladie de NPC en fonction de ses concentrations (Stern et al. 2024). De plus, ces études indiquent que le CT et ses métabolites pourraient être impliqués dans le développement de la maladie de NPC ou d'autres pathologies associées à la formation du CT et de ses métabolites. Parmi ces métabolites, le dérivé sulfaté du CT conduit à la formation du CDS (Song et al. 2001), dont l'impact n'a pas encore été évalué en raison de son

hydrolyse rapide par la stéroïde sulfatase (STS) (Segala et al. 2013) . Pour contourner cette limitation biologique, la synthèse de dérivés résistants à l'activité de la STS, comme le remplacement du groupement sulfonate par un groupement sulfate, représente une approche chimiquement possible (El-Abid et al. 2024) et discutée dans l'article 1.

D'autre part, le CT a été identifié comme un précurseur de métabolites secondaires impliqués dans la carcinogènes. Il exerce des effets génotoxiques en générant des espèces réactives de l'oxygène (Y. W. Cheng et al. 2005) et peut être converti en oncométabolite, appelé oncostérone (OCDO) (Voisin et al. 2017).

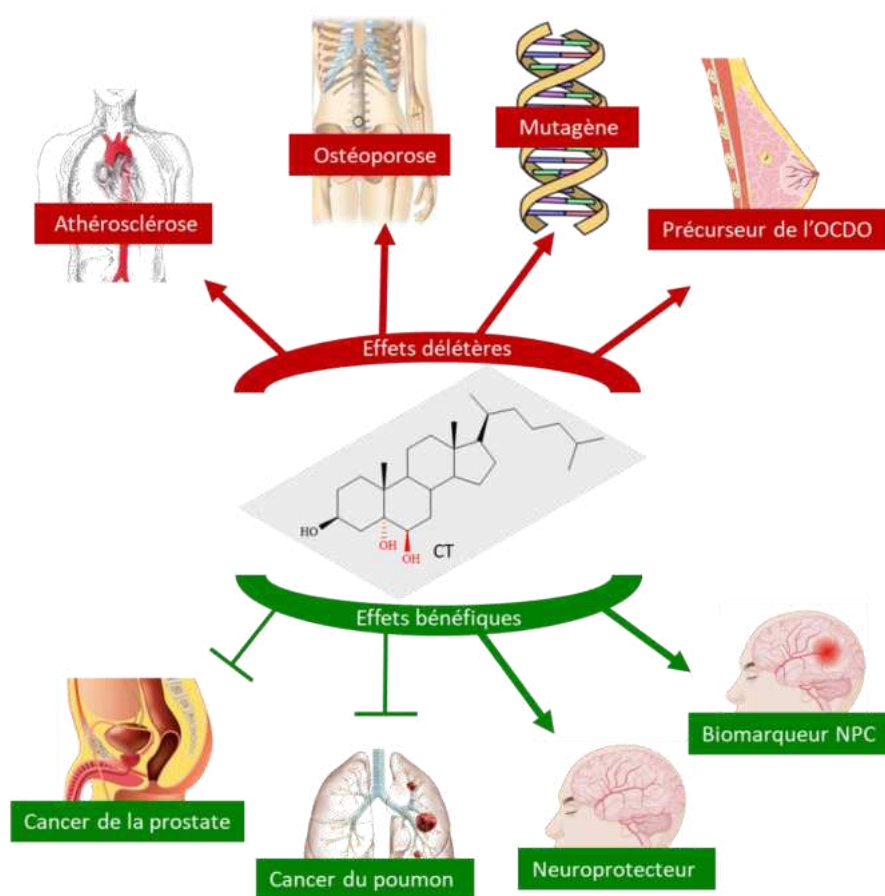


Figure 58: Effets bénéfiques et délétères du CT rapportés dans la littérature.

### 5.3. 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol (OCDO)

L'OCDO (6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol ou cholestan-6-one-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol) a été isolé pour la première fois depuis le foie de porc à partir du cholestérol radiomarqué  $^{14}\text{C}$ -CH (Schwenk et al. 1952). Cette identification a été possible grâce à la synthèse du standard de l'OCDO à partir

du CT décrite pour la première fois en 1949 par Fieser et ses collègues (Fieser et Rajagopalan 1949). Par la suite, d'autres méthodes de synthèse ont été développées en partant du cholestérol, telles que la méthode en deux étapes décrite par Murphy (Pulfer et Murphy 2004) et la méthode en une seule étape décrite par Voisin (Voisin et al. 2014) avec la formation de l'intermédiaire CT, précurseur obligatoire de l'OCDO. La formation de l'OCDO à partir du CT a également été suspectée en 1963, après l'administration orale de  $^{14}\text{C}$ -CT radiomarké à des rats (Kikuchi et al. 1968). Une expérience similaire réalisée en 1971 a confirmé cette observation, en isolant et en caractérisant l'OCDO, avec environ 23 % d'OCDO formé à partir du  $^{14}\text{C}$ -CT retrouvé dans les fèces, 24 heures après son administration orale (Roscoe et Fahrenbach 1971). Leland Smith a proposé que la formation de l'OCDO dans les systèmes biologiques résulte de la déshydrogénation du triol au niveau de la fonction alcool en position C6 (C-OH) en fonction cétone (C=O), un processus dont le mécanisme exact n'était pas encore déterminé (L. L. Smith et al. 1967). De plus, aucune formation d'OCDO à partir du cholestérol par auto-oxydation n'a été rapportée (Poirot et al. 2018).

En 2017, notre équipe a montré que dans les cellules de cancer du sein (CS), le CT est métabolisé en OCDO (Voisin et al. 2017). Cette étude a mis en évidence que l'enzyme 11 $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase 2 (11 $\beta$ -HSD2) est responsable de cette conversion du CT en OCDO, tandis que la 11 $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase 1 (11 $\beta$ HSD1) catalyse la réaction inverse de réduction de l'OCDO en CT, nécessitant la présence de la hexose-6-phosphate déshydrogénase (H6PD) pour la régénération de son cofacteur NADPH, et permettre son activité réductase (Voisin et al. 2017) (Figure 59). L'étude a également montré que l'OCDO stimule la prolifération et l'invasion de différentes lignées de CS indépendamment de leur expression ou non du ER $\alpha$  et que le traitement des tumeurs ER $\alpha^-$  et ER $\alpha^+$  par l'OCDO favorise la croissance et l'invasivité tumorale, accompagnée d'une augmentation du marqueur de prolifération cellulaire Ki-67. Identifiant ainsi l'OCDO comme oncométabolite, promoteur de tumeur dans le CS (Voisin et al. 2017). Dans cette étude, il a été mis en évidence que l'OCDO se lie au récepteur des glucocorticoïdes  $\alpha$  (GR $\alpha$ ) et aux LXRs mais pas au ER (Voisin et al. 2017; Philippe De Medina et al. 2021). Contrairement au 27-HC, qui stimule la croissance des CS ER $\alpha^+$  en se liant au ER $\alpha$  et favorise l'invasion tumorale via le LXR $\beta$  (voir section 2.2.2.5), l'OCDO favorise la croissance des cellules du CS indépendamment de l'ER $\alpha$ . Agissant comme un agoniste biaisé du GR $\alpha$ , l'OCDO active sélectivement les voies de signalisation qui stimulent la

prolifération cellulaire. Cependant, l'effet de l'OCDO sur l'invasion des cellules tumorales et le rôle potentiel des LXRs dans ce processus nécessitent encore des investigations approfondies (Voisin et al. 2017; Poirot et al. 2018).

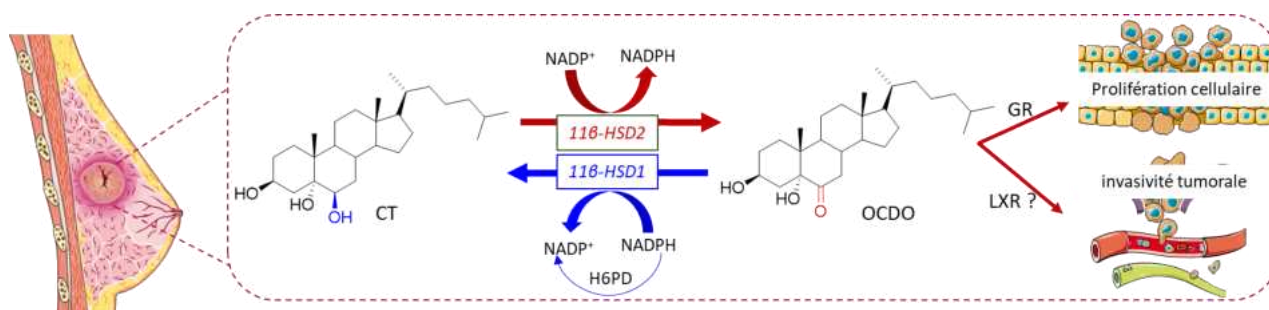


Figure 59 Schéma décrivant l'interconversion de l'OCDO et du CT par les enzymes 11β-HSD. La 11β-HSD2 convertit le CT en OCDO, tandis que la 11β-HSD1 convertit l'OCDO en CT. La H6PD est l'enzyme responsable de la production du cofacteur NADPH nécessaire à l'activité réductase de la 11β-HSD.

Les analyses immunohistochimiques sur des échantillons de patientes de CS indiquent que les enzymes impliquées dans la synthèse de l'OCDO (11HSD2, D8D7I, DHCR7) sont surexprimées dans les CS par rapport aux tissus normaux adjacents, avec une corrélation positive avec le grade tumoral. Les tumeurs ER<sup>-</sup>/PR<sup>-</sup> présentent les niveaux les plus élevés de l'expression de la DHCR7 et la D8D7I, tandis que l'expression de la 11HSD2 n'est pas associée au statut des récepteurs hormonaux. En revanche, la 11HSD1 et H6PD sont faiblement exprimées (Voisin et al. 2017). Ces résultats sont corrélés avec les concentrations d'OCDO observées dans le CS, atteignant environ 1 μM, par rapport aux tissus mammaires normaux adjacents à la tumeur où les niveaux sont de quelques nM (< 25 nM) (Voisin et al. 2017). L'analyse des bases de données d'ARNm de Kaplan–Meier de différents types de CS révèle qu'une expression élevée de 11HSD2 ou une expression faible de 11HSD1 est associée à un pronostic défavorable. De plus, une expression accrue de DHCR7 et/ou de D8D7I est corrélée à une survie réduite des patientes, avec un risque critique lorsque les niveaux d'expression de 11HSD2, DHCR7, et D8D7I sont combinés (Voisin et al. 2017; De Medina et al. 2021). Ces observations suggèrent que l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'OCDO favorisent sa production dans les tumeurs mammaires (Philippe De Medina et al. 2021). Actuellement, le métabolisme de l'OCDO est encore mal compris. Cependant, la présence d'une fonction cétone dans le cycle B suggère que l'OCDO pourrait potentiellement servir de substrat pour le CYP27A1, de manière similaire à l'oxystérol cytotoxique 7-KC, qui est métabolisé en 7KC-27HC,

une voie de détoxification pour le 7-KC (Beck, Inderbinen, et al. 2019; Heo et al. 2011a). Ainsi, la formation potentielle de 27H-OCDO pourrait représenter une voie d'inactivation et d'élimination de l'OCDO, une hypothèse qui a fait l'objet d'étude décrite dans l'article 2.

#### 5.4. Dendrogénine A (DDA)

L'étude des mécanismes moléculaires et enzymatiques du complexe AEBS par mon équipe d'accueil a permis l'identification d'une nouvelle voie métabolique chez les mammifères conduisant à la découverte de la Dendrogénine A (DDA). Les recherches antérieures menées par l'équipe ont montré que l'inhibition de l'activité enzymatique de la ChEH portée par le site AEBS par le Tam conduit à une accumulation des 5,6-ECs, et que cette inhibition de l'AEBS soit impliquée dans les effets anticancéreux induits par ces ligands par des mécanismes de redifférenciation des cellules cancéreuses (Payré et al. 2008; Philippe De Medina, Silvente-Poirot, et Poirot 2009a; Silvente-Poirot et Poirot 2012b). Le site AEBS possède également un site de liaison pour l'histamine, une amine biogène (Brandes et al. 1985), ce qui suggère que les 5,6-ECs et l'histamine pourraient s'accumuler, coexister et potentiellement interagir. Il était donc envisageable qu'une réaction de conjugaison soit possible entre les 5,6-ECs, qui possèdent un groupe époxyde électrophile, et l'histamine, qui contient des groupes amines nucléophiles. Ces adduits pourraient être responsables des effets anticancéreux associés à l'inhibition de l'AEBS, car ni les 5,6-ECs ni l'histamine, lorsqu'ils sont utilisés seuls, ne semblent induire le processus de redifférenciation des cellules cancéreuses (Philippe De Medina et al. 2009).

L'histamine (2-(1H-imidazole-4-yl)éthanamine) est constituée d'une chaîne latérale éthylamine et d'un anneau imidazole (Lieberman 2011). Elle présente deux formes tautomériques possibles, car l'atome d'hydrogène peut se localiser sur l'un ou l'autre des deux atomes d'azote dans l'anneau imidazole, soit  $N\tau$  ou  $N\pi$ . Cependant, au pH physiologique de 7,4, l'histamine est principalement sous forme de monocation (96%), protonée au niveau de la position amino libre ( $pK_a = 9,8$ ) ( $R-NH_3^+$ ) (Vianello et Mavri 2012). Cette protonation exerce un fort effet attracteur d'électrons sur l'anneau imidazole, stabilisant ainsi la charge formée. Cet effet est plus prononcé pour l'azote le plus proche de la chaîne latérale, rendant l'atome d'hydrogène lié à l'azote  $N\pi$  plus acide que celui lié à l'azote  $N\tau$ . En conséquence, le tautomère  $N\tau$  est plus favorisé que le tautomère  $\pi$  ( $N\pi$ ) (Worth et al. 1990; Tolomeu et al. 2023) (Figure

60). De plus, l'amine primaire aliphatique située sur la chaîne latérale est plus réactive que l'amine secondaire cyclique située sur le noyau imidazole, en raison de son implication dans la tautomérie (Edwards et Pearson 1962).

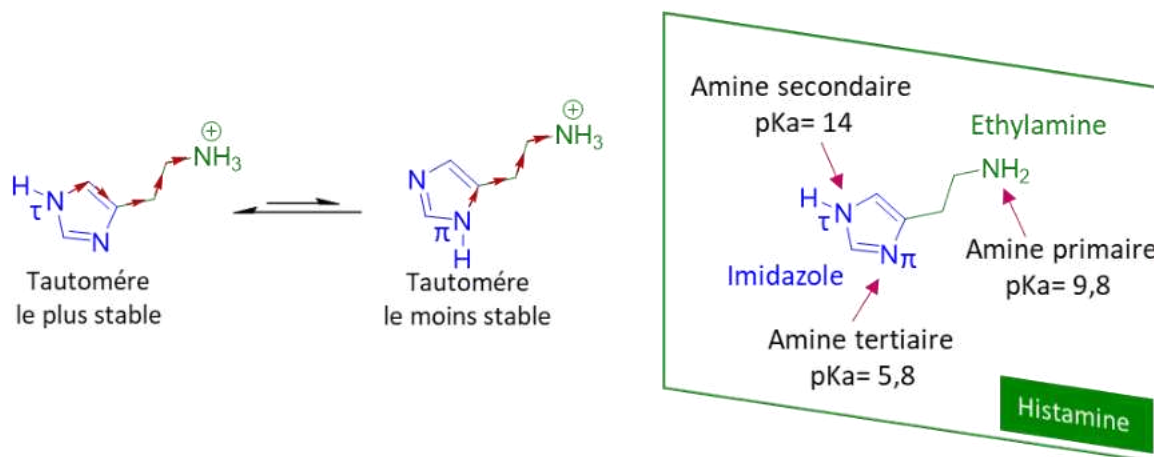


Figure 60 Représentation de l'histamine à gauche et des formes tautomériques, avec leurs valeurs de pKa respectives.

La présence de ces deux amines potentiellement réactives au sein de la structure de l'histamine a conduit l'équipe à synthétiser le produit de la réaction entre le 5,6 $\alpha$ -EC et l'histamine, désigné sous le nom de Dendrogénine A (DDA) (5 $\alpha$ -Hydroxy-6 $\beta$ -[2-(1H-imidazol-4-yl)éthylamino]cholestan-3 $\beta$ -ol) qui correspond au produit issu de l'attaque par l'amine primaire et son régioisomère, le composé désigné sous le nom C17 (5 $\alpha$ -Hydroxy-6 $\beta$ -[4-(2-Aminoethyl)imidazol-1-yl]cholestan-3 $\beta$ -ol) correspond à l'attaque par l'amine secondaire (Philippe De Medina et al. 2009) (Figure 61).

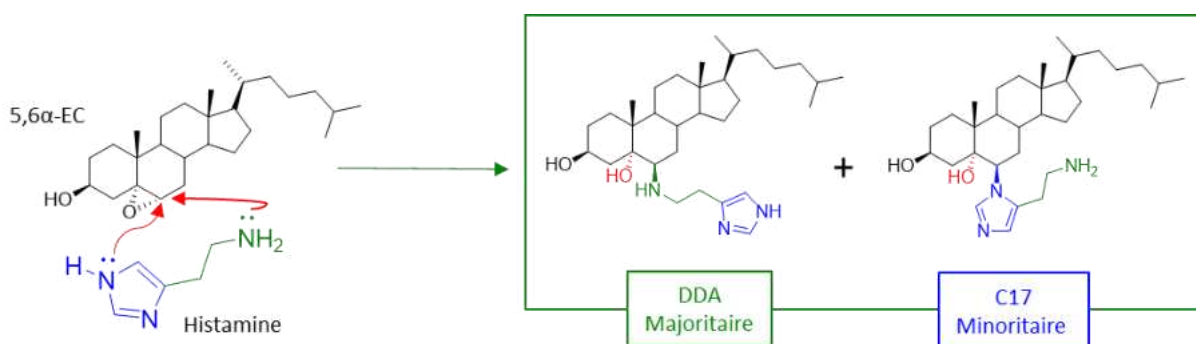


Figure 61 : Production de la Dendrogénine A (DDA) et de son régioisomère le C17 à partir de la réaction entre le 5,6 $\alpha$ -EC et l'histamine.



La disponibilité de ces standards synthétiques de la DDA et du C17 a permis de développer des méthodes d'analyse pour détecter et quantifier leur présence potentielle dans les tissus (Noguer et al. 2017; Soulès et al. 2019). L'analyse de tissus provenant de souris et d'humains a montré que la DDA était présente à des concentrations non-négligeables variant de 3 nM (plasma humain) 6.2 nM (sérum bovin) à 500 nM (foie de souris) (Philippe De Medina et al. 2013) (Figure 62). Cela indique que la DDA est un métabolite naturel commun aux mammifères et que d'autres tissus peuvent également en contenir de la DDA, tandis que le C17 a été détecté à l'état de trace (Philippe De Medina et al. 2013).

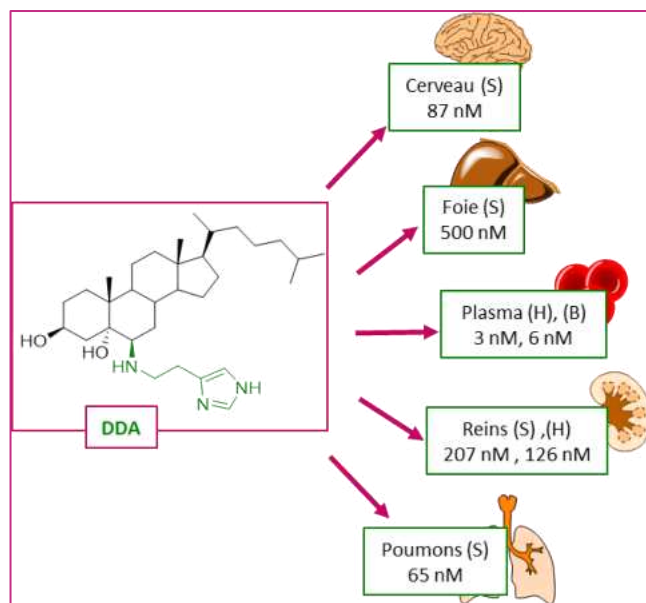


Figure 62: Quantification de la Dendrogénine A (DDA) endogène dans les tissus et fluides de mammifères : B (bovin), DDA (dendrogénine A), H (humain), S (souris).

La présence de la DDA en tant que métabolite naturel a incité l'équipe à caractériser les propriétés biologiques de cette molécule. L'équipe a montré que la DDA induit la différenciation et le contrôle de la prolifération à des concentrations de l'ordre du nM sur des lignées représentantes de différents types de cancer, mais en particulier sur des cellules de mélanome ou de cancer mammaire (Philippe De Medina et al. 2009). De plus, il a été observé que des expositions plus longues ou l'utilisation de concentrations plus élevées de DDA de l'ordre du  $\mu\text{M}$  entraînaient une cytotoxicité dose-dépendante conduisant à la mort cellulaire (Philippe De Medina et al. 2009) (Figure 63). Les études *in vivo* ont également montré que la DDA contrôle la croissance des tumeurs implantées chez la souris et améliore leur survie (Philippe De Medina et al. 2013). Ces

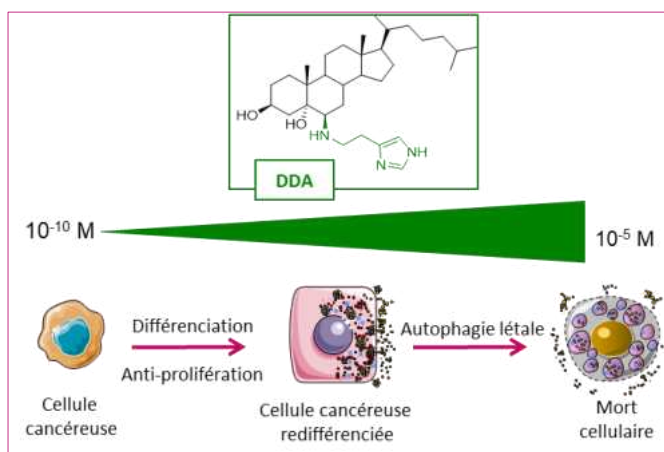


Figure 63 : La Dendrogénine A (DDA) induit la différenciation des cellules cancéreuses humaines et murines à des concentrations de l'ordre du nM et de la cytotoxicité à des concentrations de l'ordre du  $\mu\text{M}$ .

effets sont associés à une augmentation de l'infiltration des cellules dendritiques et des lymphocytes T dans les tumeurs (Philippe De Medina et al. 2013), ainsi qu'à la capacité de la DDA à stimuler la production d'exosomes antitumoraux par les cellules tumorales, contribuant ainsi à la réponse antitumorale (Record et al. 2022). De plus, la DDA exerce une inhibition sélective de la ChEH à des doses endogènes, entraînant une réduction de la formation du CT et de l'OCDO dans les cellules cancéreuses mammaires, avec une efficacité 100 fois et 42 fois supérieure à celle de ses ligands naturels, le 7 $\alpha$ -HC et le 7-KC, respectivement (Philippe De Medina et al. 2013). Cette réduction est accompagnée de l'accumulation des  $\Delta$ 8-stérols (zymosténol et le 8-déhydrocholestérol) par son inhibition de la sous unité EBP mais aucune accumulation des 5,6-ECs n'a été observée à la différence de ce qui est observé avec le Tam et le PBPE (Segala et al. 2017b). Ces données indiquent que la DDA est le plus puissant des inhibiteurs naturels connus de la ChEH à ce jour, un effet qui pourrait être lié à ses propriétés anti-tumorales observées *in vitro* et *in vivo*, tandis que le C17 ne montre aucun de ces effets observés avec la DDA (Philippe De Medina et al. 2013).

L'étude des mécanismes moléculaires responsables de la cytotoxicité de la DDA a révélé qu'elle induisait une autophagie létale. Des études biochimiques ont démontré que la DDA est un ligand des récepteurs LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ . Des études génétiques et pharmacologiques réalisées au laboratoire démontrent que le LXR $\beta$  est nécessaire et suffisant pour activer le processus d'autophagie létale *in vitro* et *in vivo* (Segala et al. 2017b). En se liant au LXR $\beta$ , la DDA stimule l'expression de gènes régulateurs de l'autophagie, tels que ceux codant pour les protéines NR4A1 (Nur77) et NR4A3 (NOR1) (récepteur nucléaire de la sous-famille 4, groupe A, membre 1 et 3 respectivement), la protéine LC3 qui est indispensable à la formation d'autophagosomes, ainsi que le facteur de transcription EB (TFEB), un régulateur majeur de l'autophagie et de la biogenèse lysosomale (Segala et al. 2017b) (Figure 64). Cependant, la DDA n'est pas un agoniste canonique des LXR, mais un agoniste biaisé. Contrairement aux ligands canoniques des LXR, la DDA exerce une action antagoniste sur certains gènes sous contrôle des LXRs, tel qu'ABCA1. La DDA est sans effet sur SREBP1, mais agit comme un agoniste sur l'expression du LDLR et d'ABCG5 (Segala et al. 2017b; Silvente-Poirot et al. 2018). Les ligands canoniques des récepteurs LXRs, tels que le T0091317, le GW-3965 ou le 22(R)HC n'induisent pas les effets observés avec la DDA sur l'activation de l'expression des gènes qui

contrôlent l'autophagie. Cela indique que la DDA représente une nouvelle classe de modulateur sélectif des récepteurs LXRs (SLiM) (Poirot et Silvente-Poirot 2018).

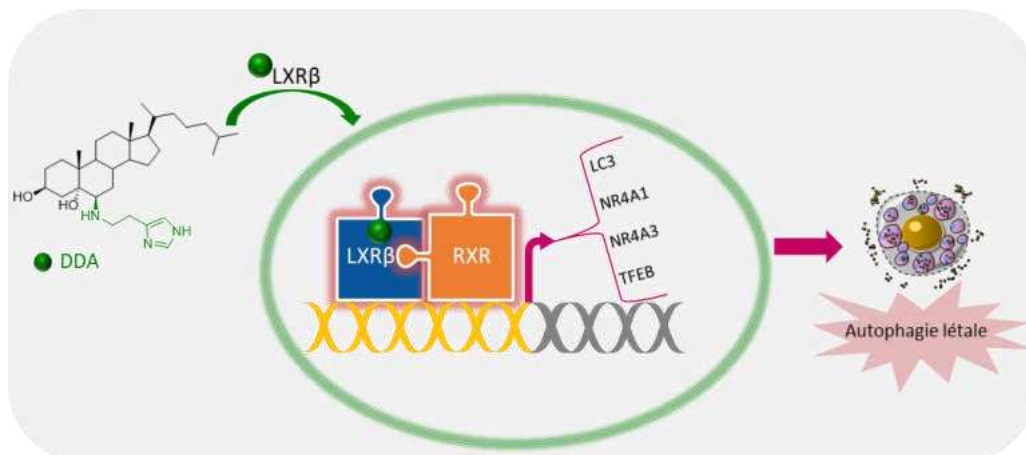


Figure 64: Mécanisme de l'autophagie létale induite par la DDA : Rôle de sa liaison au LXRβ et de l'activation transcriptionnelle des gènes impliqués dans ce processus, LC3, NR4A1, NR4A3 et TFEB dans les cancers *in vitro* et *in vivo*.

L'activité de la DDA à de faibles concentrations sur les lignées cellulaires cancéreuses a conduit l'équipe à quantifier la DDA *in vitro* dans des cellules cancéreuses humaines et murines représentant plusieurs types de cancer, ainsi que dans des cellules normales (Philippe De Medina et al. 2013). La DDA était présente dans les lignées de cellules normales et absente dans toutes les lignées cancéreuses testées. Dans le cas des cellules mammaires normales, elle a été quantifiée à 8,2 ng/mg de protéines, tandis qu'elle n'était pas détectable dans les lignées de cellules cancéreuses mammaires (Philippe De Medina et al. 2013). De plus, l'analyse d'échantillons de biopsies prélevées chez des patientes atteintes de cancer du sein, ainsi que des tissus normaux adjacents, a révélé que la DDA est présente dans les tissus mammaires normaux avec une concentration de  $72 \pm 28$  ng par g de tissu. En revanche, dans les tumeurs mammaires, cette concentration est réduite de plus de cinq fois, atteignant seulement  $15 \pm 6$  ng par g de tissu (Philippe De Medina et al. 2013) (Figure 65).

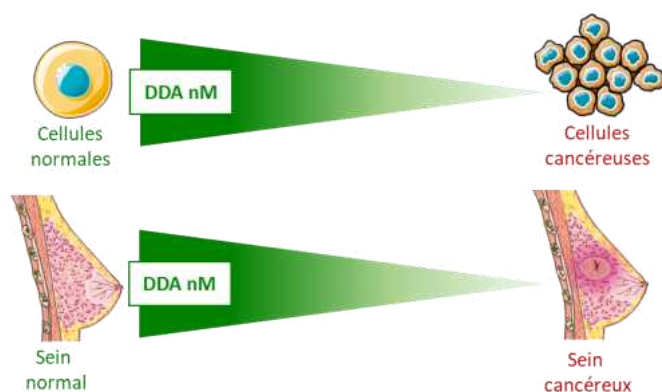


Figure 65 : Quantification de la DDA endogène dans les cellules normales et tumorales, ainsi que dans les tumeurs mammaires humaines et les tissus adjacents.

Les études structure-activité menée au laboratoire ont montré que les modifications structurales suivantes entraînent une diminution voir une perte totale des effets observés avec la DDA : la présence d'une double liaison en position C7-C8 sur le cycle B, l'ajout d'un groupe éthyle en C24 de la chaîne latérale isooctyle ou son remplacement par un groupe cétone, le greffage de l'histamine via son anneau imidazole (C17), et le greffage d'un groupement ester butyrique au niveau du 3 $\beta$ -OH (Philippe De Medina et al. 2009). De plus la modélisation par docking moléculaire de la DDA dans le domaine de liaison aux ligands des isoformes de LXR ont mis en évidence l'importance de ces groupements spécifiques de la DDA pour son interaction avec des acides aminés clés des récepteurs LXRs (Segala et al. 2017b; Poirot et Silvente-Poirot 2018). Les expériences menées par l'équipe indiquent que la production endogène de la DDA nécessite l'implication d'une enzyme. L'incubation du 5,6 $\alpha$ -EC ou du 5,6 $\beta$ -EC avec l'histamine en présence d'homogénat cérébral frais a montré que la DDA se forme uniquement à partir du 5,6 $\alpha$ -EC en présence de l'histamine et d'homogénat cérébral. Aucune réaction n'a été observée avec le 5,6 $\beta$ -EC ou en absence d'homogénat cérébral. Le traitement de l'homogénat par chauffage ou par une enzyme protéolytique inhibe la réaction de conjugaison. Ceci indique que dans cet homogénat la conjugaison du 5,6 $\alpha$ -EC avec l'histamine n'est pas spontanée (voir section réactivité des 5,6-ECs) et est stéréospécifique pour le 5,6 $\alpha$ -EC, et nécessite une enzyme de nature protéique pour permettre sa production endogène. Il apparait donc nécessaire d'identifier cette enzyme inconnue à ce jour, responsable de la biosynthèse de la DDA, qui est le premier alcaloïde stéroïdien endogène et présentant des propriétés suppresseur de tumeur, découvert à ce jour chez les mammifères (Philippe De Medina et al. 2013).

En conclusion, ces travaux révèlent l'existence d'une nouvelle branche métabolique dans la voie du cholestérol, centrée sur les 5,6-ECs générant la DDA ou l'OCDO. De plus, ces travaux révèlent une dérégulation du métabolisme de la DDA au cours de la progression tumorale. Cette dérégulation est associée à la production d'OCDO, suggérant l'existence d'une balance entre l'OCDO, un promoteur de tumeurs, et la DDA un suppresseur de tumeurs, contrôlant la carcinogénèse mammaire (Philippe De Medina, Silvente-Poirot, et Poirot 2022) (Figure 66).

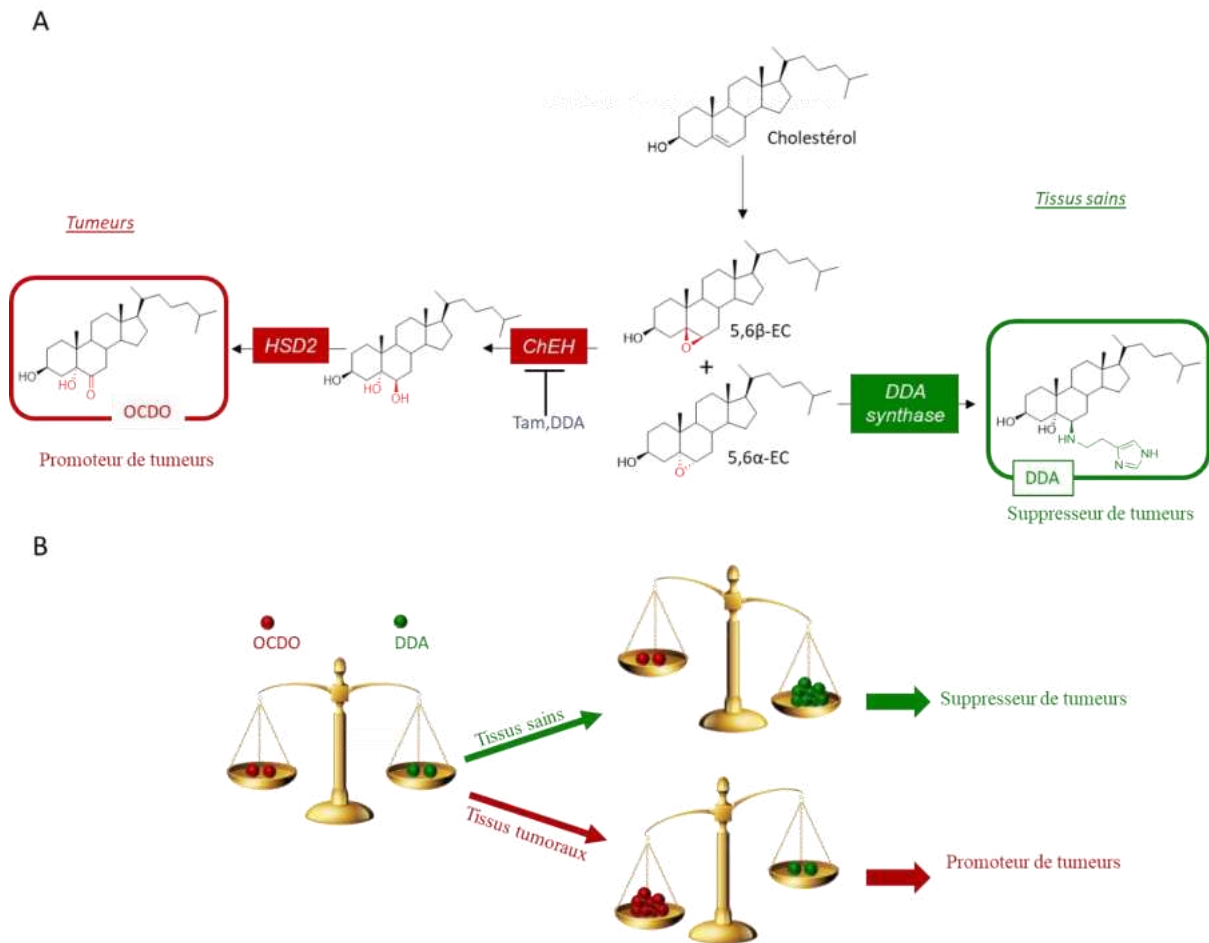


Figure 66 : A : voie métabolique centrée sur les 5,6-ECs, menant à la formation de la DDA, molécule suppresseur de tumeurs dans les tissus sains et à l'OCDO promoteur de tumeurs dans les tissus cancéreux. B : Dérégulation de la balance métabolique dans le processus tumoral.

## 6. Les 5,6-époxycholestanoles (5,6-ECs) : LE PHÉNIX

Les 5,6-ECs, d'abord perçus comme de simples produits d'autoxydation du cholestérol avec des propriétés mutagènes et donc considérés comme biologiquement peu significatifs, avaient été largement ignorés. Cependant, à l'instar du Phénix qui renaît de ses cendres, ces composés ont retrouvé une nouvelle pertinence depuis que mon équipe d'accueil a identifié une nouvelle branche métabolique dans la voie du métabolisme du cholestérol, centrée sur les 5,6-ECs. Une voie sur laquelle j'ai pu consacrer les trois années de ma thèse.

D'un point de vue biologique, les molécules endogènes ou exogènes contenant un groupement époxyde peuvent avoir des effets bénéfiques ou délétères selon leur structure. Par exemple, l'acide arachidonique (20:4,  $\omega$ -6) est métabolisé par les enzymes CYP450 en acides époxyeicosatriénoïques (EETs) ou par les lipooxygénases pour former les leucotriènes A<sub>4</sub> (LT<sub>4</sub>), jouant des rôles cruciaux dans l'organisme comme la régulation de la réponse inflammatoire (Chacos et al. 1983). En revanche, les époxydes issus de xénobiotiques, comme le styrène-7,8-oxyde et le *trans*-9,10-époxy-7,8-dihydrodiol benzo[a]pyrène, provenant respectivement du styrène et le benzo[a]pyrène sont reconnus pour leurs effets mutagènes. Ces composés peuvent former des adduits covalents avec l'ADN, ce qui peut entraîner des mutations dans le genome et favoriser l'apparition de cancers (Ashurst et Cohen 1980; Koskinen et Plná 2000; Vodicka et al. 2002). La présence de ce groupement oxirane électrophile au niveau de la structure des 5,6-ECs suggérait qu'ils pourraient réagir spontanément avec les entités nucléophiles, se comportant comme des agents alkylants de l'ADN (Bischoff 1969) avec des propriétés mutagènes directes (Sevanian et Peterson 1984; 1986) similaires à celles observées pour les époxydes aliphatiques et aromatiques (Wade et al. 1978). De plus, ils ont également été suspectés d'être des agents dermatocarcinogènes, mettant un lien entre leur accumulation et la survenue de cancers de la peau induits par les UV (Black et Lo 1971; Lo et Black 1973; J. T. Chan et Black 1974). Cependant, d'autres études n'ont pas pu mettre en évidence ce caractère carcinogène des 5,6-ECs. Par exemple, une étude menée par El-Bayoumy (el-Bayoumy et al. 1996) n'a pas révélé de propriétés cancérigènes lorsque les 5,6-ECs ont été injectés sur les mamelles de rats et l'équipe de Peterson (Peterson et al. 1988) n'ont pas réussi à établir une liaison covalente entre le 5,6-EC et l'ADN. Par la suite, Chang et ses collègues ont suggéré que le caractère carcinogène pourrait

être attribué à la formation d'espèces oxydées du 5,6-EC et met en évidence que seul le CT comparant aux 5,6-ECs et 7-KC possède des propriétés mutagènes par un mécanisme impliquant un stress oxydatif (Y. W. Cheng et al. 2005), suggérant qu'une ou des espèces oxydées du CT sont impliquées dans ces effets. Ceci est cohérent avec les travaux de l'équipe montrant que la formation de l'OCDO à partir du CT est un métabolite oxydé pro-tumoral (Voisin et al. 2017).

Cependant, dans les récentes études menées par mon équipe d'accueil, ils ont montré que les 5,6-ECs sont extrêmement stables et totalement non réactifs envers les nucléophiles, et aucune formation d'adduit covalents sur les bases de l'ADN, dont la guanine, à température ambiante et physiologique, n'est observée contrairement au styrène-7,8-oxyde qui est un carcinogène mutagène (Paillasse et al. 2012). De plus, les 5,6-ECs restent stables dans le temps même en présence de concentrations très élevées de nucléophiles, ce qui exclut l'hypothèse qu'ils soient réactifs de manière spontanée ou qu'ils se comportent comme des agents cancérigènes ou alkylants directs (Paillasse et al. 2012). Néanmoins, les premières observations menées sur les 5,6-ECs ont amené les chercheurs à proposer que la DDC, l'adduit résultant de la conjugaison du 5,6 $\alpha$ -EC avec le GSH catalysé par la rGST, soit une voie de détoxification et d'élimination des 5,6-ECs en partant du principe que ces 5,6-ECs seraient cancérigènes. En conséquence, aucune étude n'a encore exploré si la DDC est un métabolite, ni si l'équivalent humain de la rGSTA1 est capable de catalyser la conjugaison du 5,6 $\alpha$ -EC avec le GSH et d'autres nucléophiles biogènes, tant *in vitro* qu'*in vivo*. Il est donc nécessaire de déterminer si l'enzyme GSTA1 humaine (hGSTA1) pourrait catalyser ce type de réaction de conjugaison et si les adduits formés sont des métabolites bioactifs.

### 6.1. Réactivité des 5,6-ECs

La présence du cycle oxirane (époxyde) au sein de la structure des 5,6-ECs constitue un groupe fonctionnel important en chimie. Ce cycle est constitué d'un atome d'oxygène lié à deux atomes de carbone adjacents par des liaisons covalentes simples, formant un hétérocycle à trois chaînons offrant un excellent compromis entre stabilité et réactivité (Walsh 1949; Meng et al. 2021). Chimiquement, les époxydes peuvent être produits par oxydation chimique d'alcène en présence d'agents oxydants. La méthode la plus courante pour cette époxydation



est celle de Prilezhaev, utilisant des peracides ( $R-C-O-OH$ ), le plus souvent l'acide meta-chloroperoxybenzoïque (MCPBA) comme agent oxydant (Prileschajew 1909).

En plus d'être commercialisé, peu coûteux et facile à utiliser, ce peracide est relativement stable dans le temps, moins susceptible de provoquer des réactions secondaires d'ouverture de cycle (White et Emmons 1962), et permet d'obtenir un bon rendement d'époxydation (Petrović et al. 2002). Le mécanisme d'époxydation généralement accepté, appelé « mécanisme papillon », a été proposé par Bartlett en 1950. Dans ce modèle, le peracide forme une liaison hydrogène intramoléculaire à l'état de transition, donnant une structure qui rappelle celle d'un papillon (Figure 67) (Moser et al. 2022). Ce mécanisme est initié par l'attaque nucléophile des électrons  $\pi$  de la double liaison  $C=C$  sur l'atome d'oxygène de la liaison  $O-O$  ( $\sigma^*_{O-O}$ ) du peracide. Cette liaison  $O-O$  constitue la force motrice de la réaction, elle est relativement faible (34 kcal/mol), se clive facilement permettant le transfert de l'oxygène à l'alcène pour former l'époxyde (Bach et al. 1996; Hussain et al. 2014). De manière concertée, le proton est transféré vers l'oxygène du groupe carbonyle, générant une quantité équimolaire d'acide chlorobenzoïque comme sous-produit (Rebek et al. 1986). Cet acide peut être éliminé par une simple extraction liquide-liquide, où il passe dans la phase aqueuse en raison de sa solubilité dans l'eau, laissant l'époxyde formé dans la phase organique. La stéréochimie des époxydes formés est déterminée par celle de l'alcène de départ, les alcènes *cis* donnent des époxydes *cis*, et les alcènes *trans* génèrent des époxydes *trans* lors de l'époxydation. Cependant, l'ajout de l'oxygène se fait préférentiellement du côté le moins encombré de l'alcène, ce qui peut aboutir à un mélange de stéréoisomères de configurations opposées ou de façon majoritaire à l'un des stéréoisomères (Hussain et al. 2014).

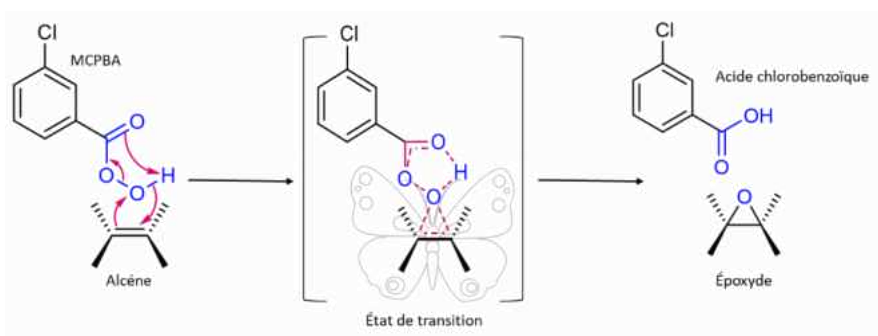


Figure 67 : Mécanisme de l'époxydation de l'alcène par le peracide MCPBA : Illustration de l'intermédiaire « papillon » et la conservation de la stéréochimie de l'alcène.

Cette méthode est appliquée au sein de notre équipe pour la synthèse des 5,6-ECs à partir du cholestérol. En effet, l'époxydation du cholestérol par le MCPBA conduit à la formation majoritaire du 5,6 $\alpha$ -EC (75%) et minoritaire du 5,6 $\beta$ -EC (25%) (Philippe De Medina et al. 2009) (Figure 68). Cette sélectivité s'explique par le fait que les quatre cycles du noyau stéroïdien cholestérol sont tous dans le même plan. Les groupes méthyles (CH<sub>3</sub>), plus volumineux, se trouvent au-dessus du plan aux positions C18 et C19 (Poirot et Silvente-Poirot 2013a). En raison de cette configuration, l'époxyde 5,6 $\alpha$ -EC est majoritaire, car l'époxydation se produit à partir de la face- $\alpha$  inférieure du plan, opposée aux groupes méthyles, rendant cette voie d'époxydation moins encombrée et plus favorable. En revanche, dans le cas de l'époxyde 5,6 $\beta$ -EC, la formation de l'époxyde se produit sur la face- $\beta$  au-dessus du plan, du même côté que les groupes méthyles. Cette configuration stériquement encombrée rend la double liaison moins accessible à l'époxydation. Par conséquent, cette voie est défavorisée, ce qui explique pourquoi le 5,6 $\beta$ -EC est minoritaire (Philippe De Medina et al. 2009) (Figure 68).

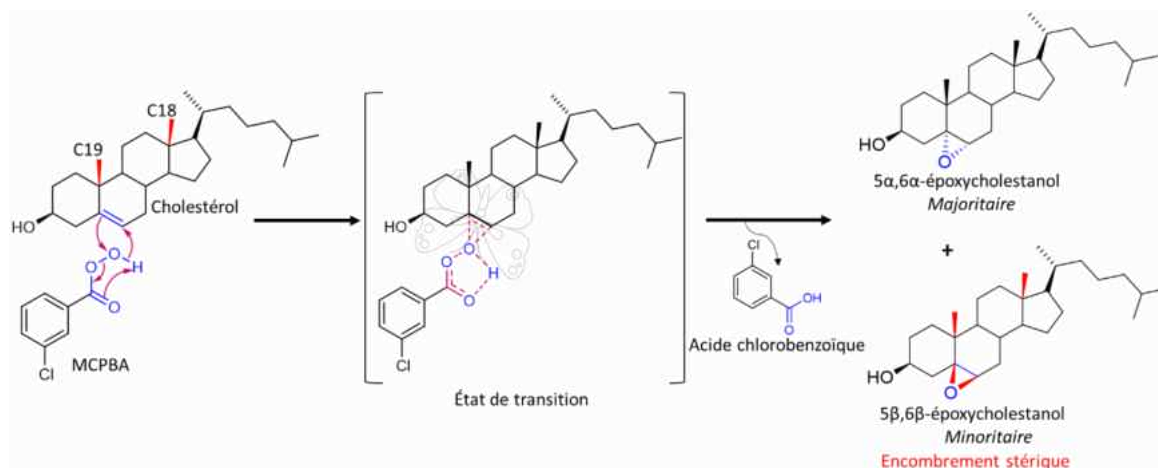


Figure 68: Mécanisme de l'époxydation du cholestérol par le MCPBA avec illustration de l'intermédiaire « papillon » et la conservation de la stéréochimie du cholestérol, avec la formation majoritaire du 5,6 $\alpha$ -EC.

Les oxiranes sont considérés comme réactifs pour deux raisons principales. Premièrement, le cycle à trois atomes présente une tension angulaire élevée, avec des angles C-O-C  $\approx 61,6^\circ$ , contrairement à l'angle de liaison idéal  $\approx 109^\circ$ , ce qui réduit leur stabilité. Deuxièmement, les oxiranes agissent comme des bases de Lewis, se protonant sur l'oxygène en milieu acide, créant une charge positive sur l'oxygène (Figure 69). Cela en fait un bon groupe partant,

facilitant l'attaque nucléophile sur le carbone (Alvarez-Builla 2011).

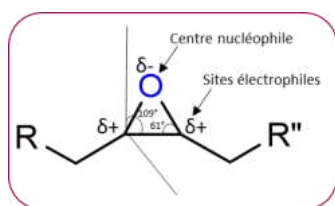


Figure 69 : Représentation des charges partielles de l'époxyde :  $\delta^-$  sur l'oxygène (centre nucléophile) et  $\delta^+$  sur les carbones de l'oxirane (sites électrophiles) avec l'angle de liaison entre les atomes

Cette fragilité structurale rend les oxiranes particulièrement vulnérables aux réactions d'ouverture de cycle par l'attaque de nucléophiles, tels que les amines ( $R-NH_2$ ), les alcools ( $O-H$ ) et les thiols ( $S-H$ ), entraînant l'ouverture *trans*-diaxial du cycle (Fürst et Plattner 1949), et la formation de nouvelles liaisons carbone-oxygène et carbone-nucléophile (Dembitsky 2023). Selon les conditions opératoires, l'ouverture de l'époxyde par un nucléophile peut suivre soit un mécanisme de substitution nucléophile de type 1 ( $SN_1$ ) ou de type 2 ( $SN_2$ ). Sous des conditions acides, le mécanisme  $SN_1$  est favorisé (Figure 70). Ce mécanisme se déroule en deux étapes : d'abord, l'époxyde est activé par la protonation de l'oxygène, ce qui entraîne l'ouverture du cycle et la formation d'un carbocation intermédiaire. Ce carbocation se stabilise préférentiellement sur le carbone le plus substitué. Ensuite, l'attaque régiosélective du nucléophile sur le carbone le plus substitué, conformément à la règle de Markovnikov. Alors que sous des conditions neutres ou basiques, la réaction est orientée vers un mécanisme concerté  $SN_2$  où l'attaque nucléophile se fait en une seule étape, directement sur le carbone le moins substitué de l'époxyde selon la règle anti-Markovnikov, en passant par un état de transition (Beletskaya et Nenajdenko 2019; Gorzynski et al. 1984).

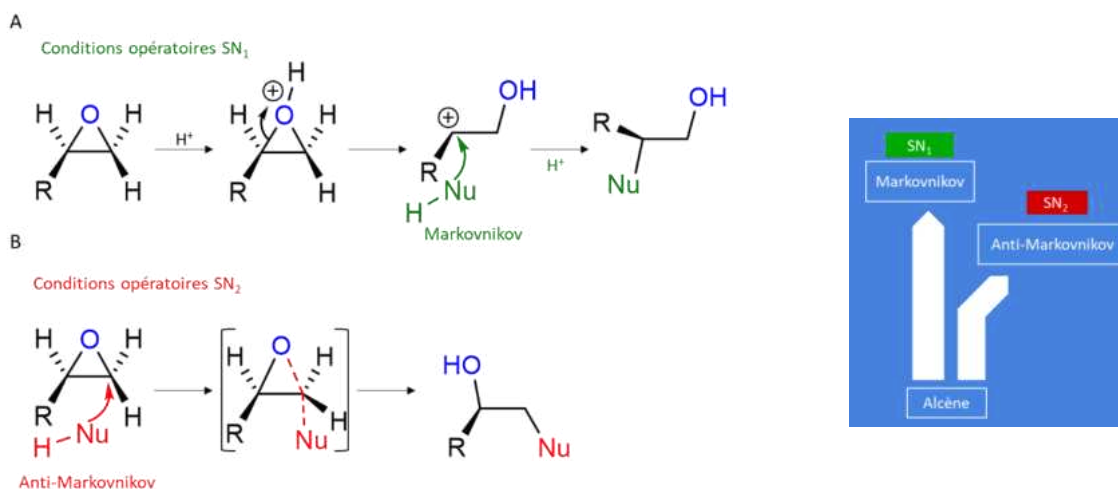


Figure 70 : A : Mécanisme d'ouverture d'un époxyde par substitution nucléophile de type 1 ( $SN_1$ ) ; B : Mécanisme d'ouverture d'un époxyde par substitution nucléophile de type 2 ( $SN_2$ ).

En théorie, la réactivité des 5,6-ECs envers les nucléophiles pourrait potentiellement conduire à la formation de composés résultants de l'attaque nucléophile sur les positions C5 ou C6 de chaque diastéréoisomère, 5,6 $\alpha$ -EC et 5,6 $\beta$ -EC (Poirot et Silvente-Poirot 2013a) (Figure 71).

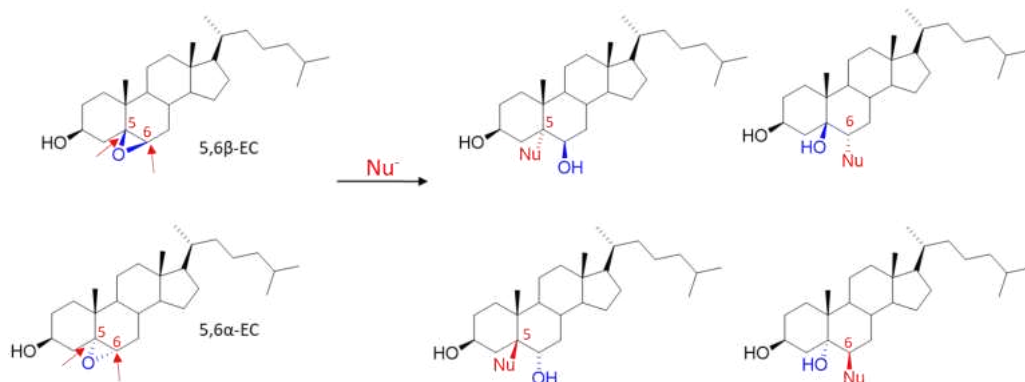


Figure 71 : Produits théoriquement possibles par la réactivité des 5,6-ECs envers les nucléophiles

Cependant, dans les conditions expérimentales, ces époxydes se sont révélés non-réactifs à température ambiante ainsi qu'à température physiologique de 37 °C, même en présence d'excès de nucléophiles tels que des amines (R-NH<sub>2</sub>), des groupements thiols (R-SH) ou la guanine (Paillasse et al. 2012). En revanche, le styrène-7,8-oxyde cancérigène (Koskinen et Plná 2000) a réagi avec les nucléophiles testés dans ces mêmes conditions expérimentales (Paillasse et al. 2012). Cela indique que les 5,6-ECs présentent une stabilité exceptionnelle sans réactivité spontanée vis-à-vis des nucléophiles (Paillasse et al. 2012; Poirot et Silvente-Poirot 2013a). L'utilisation d'un catalyseur chimique tels qu'un acide de lewis permettant d'accepter une paire d'électrons de l'électrophile (ceux de l'oxygène du cycle époxyde), facilitant ainsi son attaque par le nucléophile, et l'utilisation d'un catalyseur thermique tel que le chauffage à reflux ont permis de provoquer une réaction de conjugaison avec un nucléophile (Paillasse et al. 2012). Cependant, dans ces conditions, seul le 5,6 $\alpha$ -EC a réagi avec les nucléophiles, tandis que le 5,6 $\beta$ -EC n'a montré aucune réactivité mettant en évidence une différence de réactivité des deux diastéréoisomères sous ces conditions catalytiques (Paillasse et al. 2012). L'ouverture du cycle 5,6 $\alpha$ -EC est *trans*-diaxiale avec les substituants finaux orientés sur des côtés opposés suivant la règle énoncée par Fürst et Plattner qui est dictée par la stabilité énergétique du produit final obtenu (Fürst et Plattner 1949; Paillasse et al. 2012). Cette réaction suit un mécanisme de type S<sub>N</sub>2, avec une attaque préférentielle du nucléophile sur le carbone C6, le moins substitué sur sa face  $\beta$ . Cette sélectivité d'attaque sur

le C6 peut être en partie expliquée par les effets des substituants alkyles en position  $\alpha$  de l'époxy, qui exercent un effet inductif positif (+I) sur les deux carbones en C5 et C6. La densité électronique est plus centrée sur le C5 de l'époxyde (3(+I)), réduisant ainsi son caractère électrophile et par conséquent sa réactivité envers les nucléophiles (Mora et al. 2020) (Figure 72A). L'orientation d'attaque nucléophile sur la face  $\beta$  du 5,6 $\alpha$ -EC est plus favorable, avec une énergie d'activation calculée de 85 kcal/mol (Figure 71 C). En comparaison, une attaque sur la face  $\alpha$ , qui est plus encombrée, nécessiterait un apport d'énergie plus élevée de 96 kcal/mol, soit une augmentation de 11 kcal/mol (Paillasse et al. 2012) (Figure 72B).

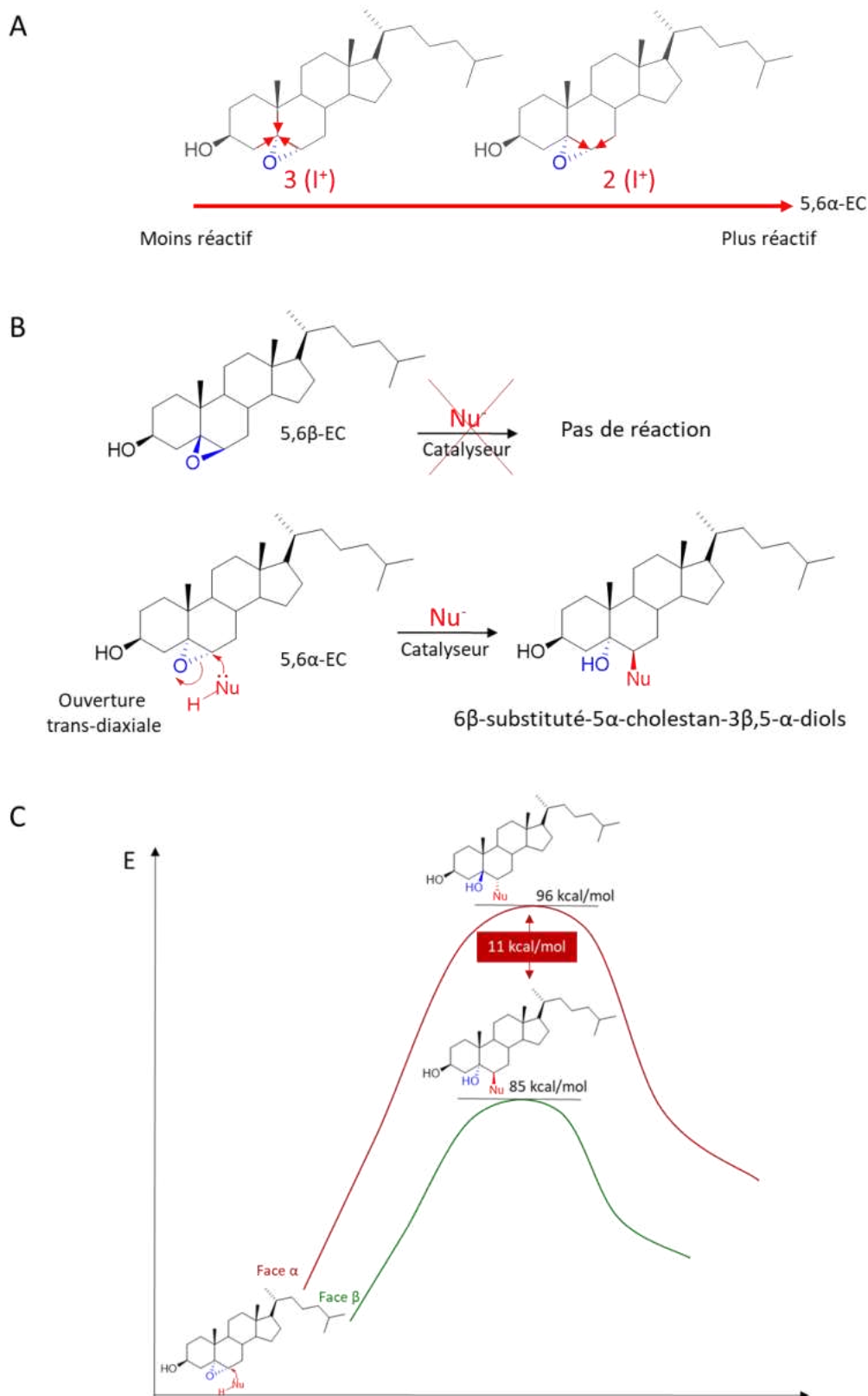


Figure 72 : A : Illustration de l'effet inductif d'électron positif des substituants sur le cycle époxyde ; B : le 5,6α-EC conduit à un unique produit d'addition avec les nucléophiles seulement en présence de catalyseurs, alors que le 5,6β-EC est inactif dans ces conditions ; C : schéma du diagramme énergétique favorisant l'attaque sur la face β, la moins encombrée conduisant au produit le plus stable énergétiquement.

Le calcul de l'énergie des structures cristallines des diastéréoisomères 5,6 $\alpha$ -EC ([SEDWOP](#)) et 5,6 $\beta$ -EC ([SEDWUV](#)) obtenues (Paillasse et al. 2012) a montré que le 5,6 $\beta$ -EC présente une énergie plus basse lui conférant ainsi une plus grande stabilité que le 5,6 $\alpha$ -EC. Une différence d'énergie de 15 kcal/mol, ce qui entraîne une barrière énergétique plus élevée pour initier la réactivité du 5,6 $\beta$ -EC dans des conditions  $SN_2$ . La superposition de ces structures cristallines des 5,6-ECs a également permis de mettre en évidence les différences conformationnelles entre ces deux structures (Figure 73).

1. Conformation des cycles : Les cycles A, C et D des deux diastéréoisomères adoptent une conformation chaise identique, tandis que le cycle B présente une torsion différente à la jonction des cycles A et B.
2. Angles de liaison : Les angles formés par les atomes de carbone au niveau des cycles diffèrent entre les deux diastéréoisomères. Au niveau du 5,6 $\alpha$ -EC, les angles formés entre les carbones C1-C10-C9 et C4-C5-C6 sont supérieurs à ceux observés au niveau du 5,6 $\beta$ -EC, avec une différence respective de 4.23° et 1.02°.
3. Volume de van der Waals : Le volume de van der Waals des 5,6-EC, basé sur les distances de liaison, les angles de liaison et les rayons de van der Waals intermoléculaires, est de 241,84 Å<sup>3</sup> pour le 5,6 $\alpha$ -EC et de 242,16 Å<sup>3</sup> pour le 5,6 $\beta$ -EC. La différence de 22,19 Å<sup>3</sup> indique que les deux structures partagent 87% de leur volume de van der Waals, avec une différence de 13%.
4. Stabilité : Comme mentionnée précédemment, le 5,6 $\beta$ -EC présente une énergie plus basse lui conférant ainsi une plus grande stabilité que le 5,6 $\alpha$ -EC, avec une différence d'énergie de 15 kcal/mol
5. Déplacements atomiques : Les déplacements mesurés montrent un déplacement de 0,68 Å de l'oxygène de l'hydroxyle en C3 et un déplacement de 0,83 Å des groupes méthyle en C19 (Paillasse et al. 2012) (Figure 73).



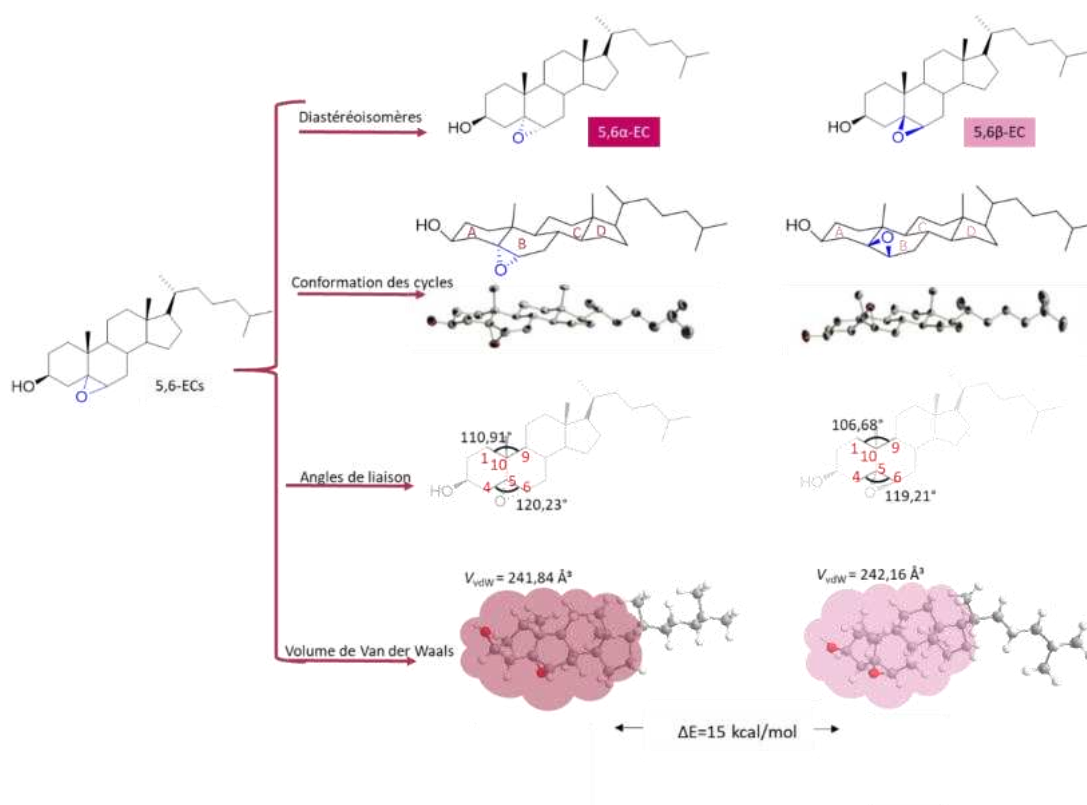


Figure 73 : Représentation des diastéréoisomères 5,6α-EC et 5,6β-EC avec leur conformation à l'état solide établie par cristallographie aux rayons X, la représentation de leurs angles de liaison ainsi que leur volume de Van der Waals.

Cette étude sur la réactivité des 5,6-ECs a permis de déterminer les conditions catalytiques optimales pour faire réagir le 5,6α-EC avec diverses amines biogéniques, telles que l'histamine. Cette réaction aboutit à la formation d'adduit 5α,6β-substitué, via un mécanisme d'attaque nucléophile S<sub>N</sub>2 qui est régiosélectif au niveau du C6, stéréosélectif sur la face β et diastéréosélectif pour le 5,6α-EC. Ce processus induit une ouverture *trans*-diaxiale du cycle et conduit à la formation du produit de conjugaison, la DDA, qui présente une stéréochimie (5R, 6R) au niveau des carbones C5 et C6 (Figure 74).

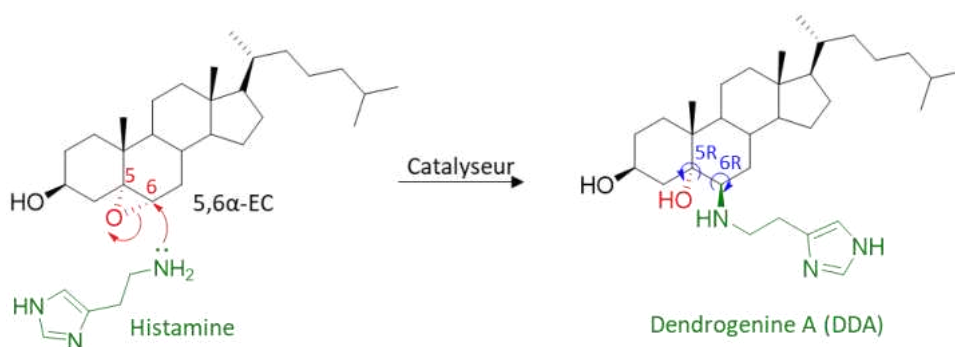


Figure 74 : Formation de dérivé 5α,6β-substitué du 5,6α-EC par réaction avec l'histamine, via un mécanisme S<sub>N</sub>2 conduisant à l'ouverture *trans*-diaxiale du cycle et production de la DDA (5R, 6R).

## 7. Implication de la Glutathion S-transférase dans le métabolisme des stéroïdes

L'existence de la glutathion S-transférase de rat (rGSTA1), qui catalyse la conjugaison stéréosélective du 5,6 $\alpha$ -EC avec le glutathion (GSH) nucléophile, suggère que son homologue humain, la glutathion S-transférase A1 (hGSTA1), pourrait catalyser une réaction similaire (Watabe et al. 1979; Meyer et Ketterer 1982). De plus, ces deux enzymes présentent environ 77% d'homologie, ce qui témoigne d'une conservation élevée de la séquence d'acides aminés entre les homologues, suggérant une fonction et une structure semblable (Axarli et al. 2017). Nous postulons également que la hGSTA1 pourrait être impliquée dans la formation de la Dendrogénine A (DDA) chez l'Homme. En effet, la réaction stéréosélective d'ouverture *trans*-diaxiale du cycle orixane du 5,6 $\alpha$ -EC par l'attaque nucléophile de l'histamine conduit à la DDA, un dérivé 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -substitué (Philippe De Medina et al. 2009). Cette réaction est analogue à celle observée avec le GSH, produisant uniquement le 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diHydroxycholestane-6 $\beta$ -yl-S-glutathion (DDC), un dérivé également 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -substitué avec la stéréochimie (5R, 6R) attendue aux positions C5 et C6 pour la DDA. Il est donc plausible que le remplacement du GSH par l'histamine comme substrat nucléophile pour la hGSTA1 puisse conduire à la formation de la DDA (Figure 75).

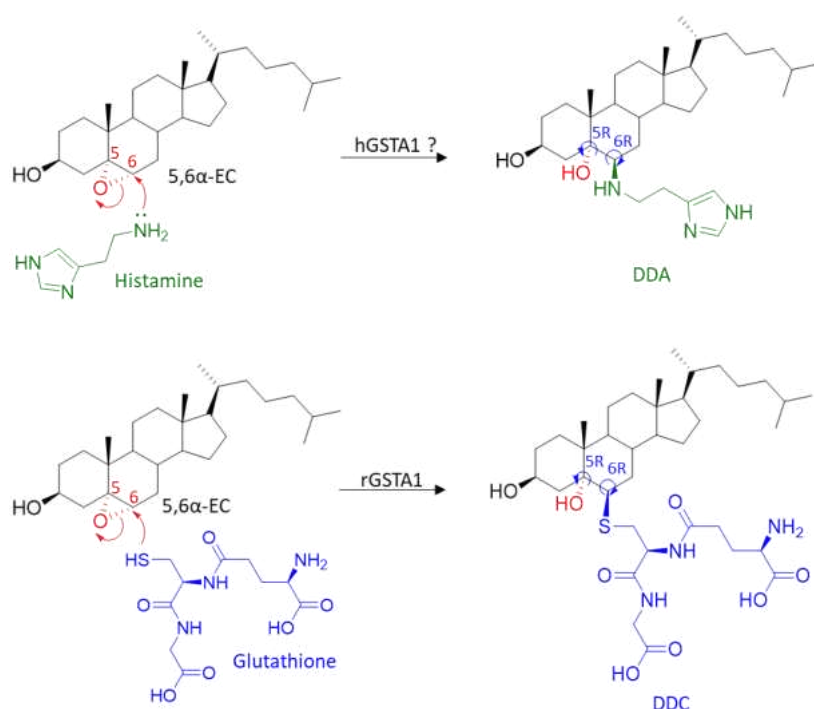


Figure 75 : Hypothèse sur la catalyse de la formation de la Dendrogénine A (DDA) par la glutathion S-transférase A1 (hGSTA1) par analogie à la glutathion S-transférase de rat (rGSTA1). La hGSTA1 pourrait catalyser la conjugaison du 5,6 $\alpha$ -EC avec

*l'histamine pour former la DDA, de manière analogue à la réaction de conjugaison du 5,6 $\alpha$ -EC avec le glutathion produisant le 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -dihydroxycholestane-6 $\beta$ -yl-S-glutathion (DDC) comme produit unique.*

De plus, les données issues de l'immunohistochimie ainsi que de la base de données [TNMPlot](#) montrent que l'expression de la GSTA1 diminue dans les tumeurs et les métastases du CS par rapport aux tissus mammaires normaux (Oğuztüzün et al. 2009), et la quantification de la hGSTA1 dans 60 lignées cellulaires cancéreuses humaines différentes n'a révélé la présence de l'enzyme que dans une minorité de ces lignées (Tew et al. 1996). Ces observations sont cohérentes avec les niveaux réduits ou quasi-absents de la DDA quantifiés dans les lignées cellulaires cancéreuses et les CS (Philippe De Medina et al. 2013). Les analyses Kaplan-Meier indiquent qu'une expression élevée de GSTA1 est associée à une meilleure survie sans récurrence dans le CS, suggérant que GSTA1 pourrait jouer un rôle protecteur contre la récurrence tumorale. Nous commencerons par donner un aperçu de cette famille d'enzymes et de leurs rôles dans le métabolisme des composés stéroïdiens.

En 1961, des études ont révélé que des extraits cytosoliques du foie pouvaient catalyser l'ajout du glutathion (GSH  $\equiv$   $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine) aux xénobiotiques aromatiques halogénés tels que le bromosulfophthaléine et les chloronitrobenzenes tels que le 1,2-dichloro-4-nitrobenzène, fournissant ainsi la première preuve directe de l'existence de l'enzyme glutathion S-transférase (EC 2.5.1.18) (Combes et Stakelum 1961; Booth et al. 1961a). Le GSH est un tripeptide composé de cystéine, de glycine et d'acide glutamique, avec une concentration intracellulaire relativement élevée variant entre 0,5 et 10 mM (Meister 1995). Il est toutefois essentiel de préciser que le nom de l'enzyme glutathion S-transférase est inapproprié, car c'est le groupe glutathionyle dans son ensemble, et non uniquement l'atome de soufre (S) qui est transféré lors de la réaction (Bengt Mannervik et al. 2005). Il a ensuite été découvert que cette activité enzymatique était en réalité le résultat de plusieurs protéines capables de catalyser l'attaque nucléophile du GSH réduit sur des composés électrophiles, selon la réaction de glutathionylation suivante :  $\text{GSH} + \text{R-X} = \text{GSR} + \text{HX}$  (Richard N. Armstrong 1994a). Ces enzymes ont par la suite été reconnues comme une classe majeure d'enzymes de phase II, jouant un rôle crucial dans le métabolisme et la détoxification d'une large variété de composés électrophiles par la voie de l'acide mercapturique (Figure 76) (Habig et al. 1974).

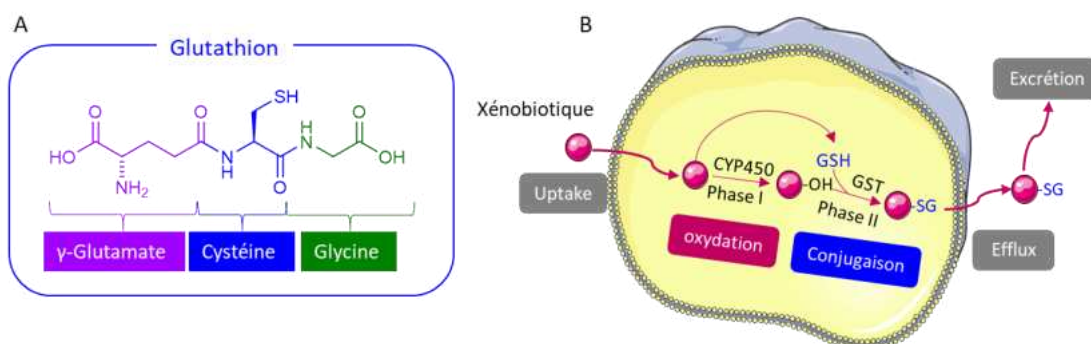


Figure 76 A: Structure moléculaire du glutathion (GSH),  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine. B: Implication des GST dans le processus de détoxification des xénobiotiques. Les xénobiotiques lipophiles sont métabolisés par les CYP450 de phase I pour augmenter leur polarité, et les intermédiaires métaboliques polaires ou les composés hydrophiles sont ensuite métabolisés par des enzymes de phase II, telles que les GSTs en conjugués R-SG solubles dans l'eau. Ces conjugués transformés en conjugués d'acides mercapturiques sont ensuite excrétés dans l'urine.

Il est désormais bien établi que les GSTs des mammifères forment une super famille qui se divise en trois familles en fonction de leur localisation subcellulaire : les GSTs mitochondriales, les GSTs microsomales et les GSTs cytosoliques (Hayes et al. 2005). Ces derniers sont les plus importants et les plus diversifiées parmi les GST humaines (Chatterjee et Gupta 2018) et sont au cœur des études de cette thèse (Article 3).

Les GST cytosoliques constituent 3 à 10 % de l'ensemble des protéines cytosoliques solubles du foie, mais sont également exprimées dans plusieurs organes, y compris le rein, les poumons, les intestins, la peau, le cerveau, et le sein (Boyer 1989; Forrester et al. 1990). Elles se présentent sous forme dimérique dans le cytoplasme des cellules, avec des sous-unités contenant entre 199 et 244 acides aminés et un poids moléculaire de l'ordre de 25 kDa (Armstrong 1994; Hayes et al. 2005). La cavité catalytique de chaque monomère des GST comprend deux sites de liaison pour les ligands. Le site G, situé dans le domaine N-terminal, est hydrophile et se lie spécifiquement au glutathion, le substrat physiologique, ce qui en fait un site fortement conservé parmi toutes les GST (Dirr et al. 1994). En revanche, le site H qui est adjacent au site G et localisé dans le domaine C-terminal, est hydrophobe et sert à la liaison de substrats électrophiles divers. Ce site H peut varier considérablement entre les différentes GSTs, offrant ainsi une vaste gamme de spécificités de liaison aux substrats (Richard N. Armstrong 1997). Elles sont classées en sept classes en fonction de la similarité des séquences d'acides aminés et des caractéristiques structurales : Alpha ( $\alpha$ ), Sigma ( $\sigma$ ), Mu ( $\mu$ ), Pi ( $\pi$ ), Omega ( $\omega$ ), Theta ( $\theta$ ), and Zeta ( $\zeta$ ) (Table). Pour les rendre compatibles avec les outils informatiques, les caractères grecs sont abrégés en lettres majuscules romaines : A, S, M, P,

O, T, Z, respectivement. Au sein de chaque classe, les sous-unités sont identifiées par des chiffres arabes. Les classes Alpha et Mu humaines comptent chacune cinq membres, tandis que les classes Theta et Omega en comptent deux chacune, et les classes Pi, Zeta et Sigma ont chacune un seul membre. Par exemple, dans leur forme active dimérique, l'homodimère constitué uniquement de la sous-unité 1 de la classe Alpha est désigné GSTA1-1, tandis que l'hétérodimère formé par les sous-unités 1 et 2 de la classe Alpha est appelé GSTA1-2 (B Mannervik et al. 1992). Les isoenzymes GST cytosoliques au sein d'une même classe partagent plus de 40 % d'identité, tandis que celles appartenant à des classes différentes ont moins de 25 % d'identité (Hayes et al. 2005). De plus, un préfixe est utilisé pour différencier les GST provenant de différentes espèces, par exemple : hGSTA1-1 et rGSTA1-1 désignent respectivement des enzymes issues de l'humain et du rat (B Mannervik et al. 1992).

Tableau 3 : Glutathion-S-Transférases cytosoliques Humaines : Classes et localisations chromosomiques des gènes, Selon (Bengt Mannervik et al. 2005).

Classes	Gènes	Isoformes	Chromosomes	Identifiants
$\alpha$ /Alpha	GSTA1	GSTA1-1 GSTA2-2 GSTA3-3 GSTA4-4 GSTA5-5	6p12.2	NP_665683 NP_000837 NP_000838 NP_001503 NP_714543
$\sigma$ /Sigma	GSTS	GSTS1-1	4q23.3	NP_055300
$\mu$ /Mu	GSTM	GSTM1-1 GSTM2-2 GSTM3-3 GSTM4-4 GSTM5-5	1p13.3	NP_666533 NP_000839 NP_000840 NP_671489 NP_000842
$\pi$ /Pi	GSTP	GSTP1-1	11q13	NP_000843
$\omega$ /Omega	GSTO	GSTO1-1 GSTO2-2	10q25.1	NP_004823 NP_899062
$\theta$ /Theta	GSTT	GSTT1-1 GSTT2-2	22q11.23	NP_000844 NP_000845
$\zeta$ /Zeta	GSTZ	GSTZ1-1	14q24.3	NP_665877

Dans leur site catalytique, les GSTs utilisent des résidus d'acides aminés au niveau N-terminal pour activer le soufre du GSH facilitant son attaque nucléophile. Selon la classe des GSTs, ces résidus peuvent être une tyrosine (pour les GST A, M, S et P), une sérine (dans les GSTT) ou une cystéine (dans les GST O et Z) (Mohana et Achary 2017). Ces résidus catalytiques

stabilisent le GSH en formant une liaison hydrogène avec le groupe sulfhydryl (SH) grâce à leurs groupes hydroxyles. Il a été montré que la tyrosine abaisse le  $pK_a$  du groupe sulfure, qui passe d'environ 9 sous sa forme libre en solution à une valeur proche de la neutralité au site actif (Kong et al. 1992), ce qui favorise la formation de l'anion thiolate ( $GS^-$ ) qui est  $10^9$  fois plus réactif que le GSH (Richard N. Armstrong 1991). Cependant, toutes ces classes d'enzymes sont capables de catalyser la réaction de glutathionylation du 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB), considéré comme substrat «commun» pour les GSTs (Clark et al. 1973). Conformément au protocole optimisé de Habig (Habig et al. 1976), ce substrat est largement utilisé pour mesurer l'activité catalytique des GST en raison de ses nombreux avantages : il est peu coûteux, facile à manipuler, offre une réaction rapide et fournit des résultats facilement interprétables par spectrophotométrie. Les GSTs catalysent la conjugaison du GSH avec le CDNB par substitution nucléophile aromatique ( $SN2_{Ar}$ ) avec un mécanisme d'addition-élimination pour former le complexe 1-(S-glutathionyl)-2,4-dinitrobenzène (GSDNB) possédant une absorbance maximale à 340 nm ( $\lambda_{max}$ ,  $\Delta\epsilon_{340nm} = 9,02 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Figure 77, Figure 78).

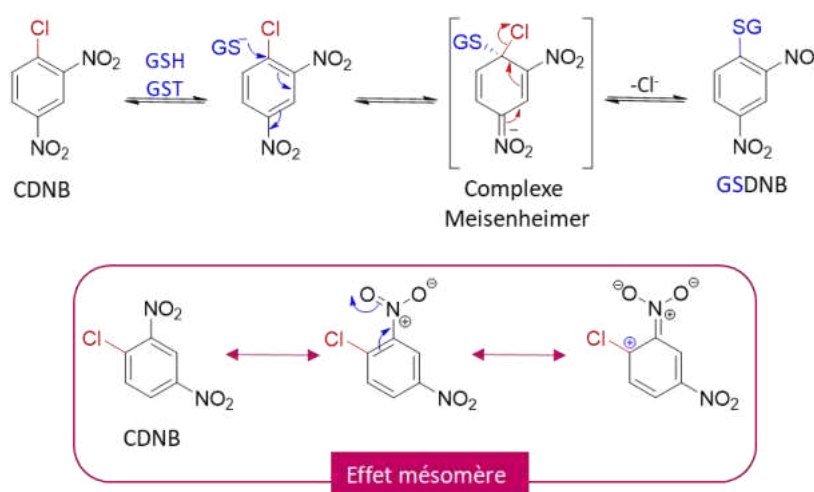


Figure 77 : Mécanisme de la substitution aromatique nucléophile ( $SN_{Ar}$ ) du CDNB par la GSH catalysée par la GST, illustrant l'effet mésomère attracteur des groupements nitro ( $NO_2$ ) sur le noyau aromatique, avec apparition des charges positives en position ortho.



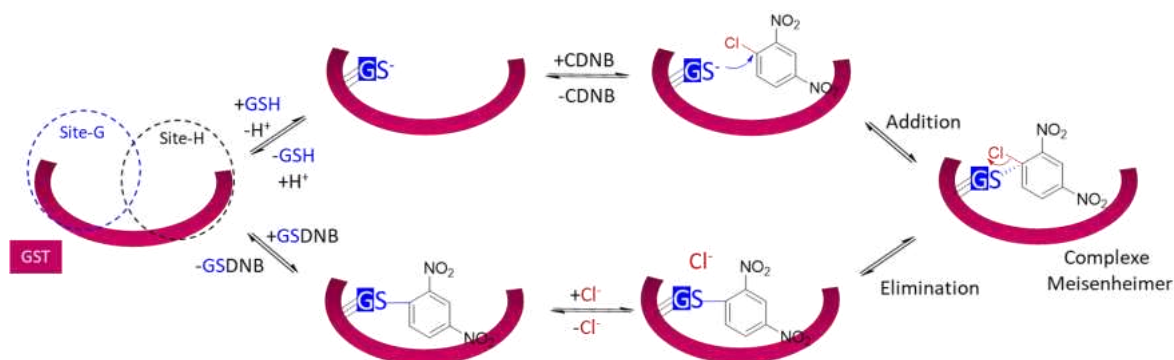


Figure 78 : Illustration de la catalyse  $SNAr$  du CDNB par le GSH au niveau du site actif de la GST : la liaison du GSH au site G de la GST diminue le  $pK_a$  du groupe thiol du GSH à environ 5,2-6,8, ce qui favorise la formation du thiolate. Simultanément, le CDNB se fixe au site H de la GST, où les effets de mésomérie des groupes nitro rendent le composé aromatique déficient en électrons. Cela facilite la substitution nucléophile aromatique ( $SNAr$ ) via un mécanisme d'addition menant à la formation de l'intermédiaire instable "complexe Meisenheimer" qui par élimination de l'anion chlorure conduit à la formation du produit final, le 1-(S-glutathionyl)-2,4-dinitrobenzène (GSDNB), ayant une absorbance maximale à 340 nm.

En plus de l'implication de la rGSTA1 dans la glutathionylation du 5,6 $\alpha$ -EC au niveau de la liaison C5-C6 du noyau stéroïde, la hGSTA1, ainsi que la hGSTA3, possède une activité spécifique d'isomérase  $\Delta^5$ - $\Delta^4$  pour les substrats 3-céto-stéroïdiens spécifiques, agissant également sur la position C5-C6 (Johansson et Mannervik 2001; Pettersson et Mannervik 2001). Elles catalysent l'isomérisation du  $\Delta^5$ -androstène-3,17-dione ( $\Delta^5$ -AD) en  $\Delta^4$ -androstène-3,17-dione ( $\Delta^4$ -AD) et du  $\Delta^5$ -pregnène-3,20-dione ( $\Delta^5$ -PD) en  $\Delta^4$ -pregnène-3,20-dione ( $\Delta^4$ -PD). Les composés  $\Delta^4$ -AD et  $\Delta^4$ -PD sont des précurseurs immédiats de la testostérone et de la progestérone, respectivement (Figure 79). Cette activité peut être mesurée par spectrophotométrie à 248 nm, avec une efficacité catalytique de la hGSTA3 environ 20 fois supérieure à celle de la hGSTA1 (Johansson et Mannervik 2001; Pettersson et Mannervik 2001).

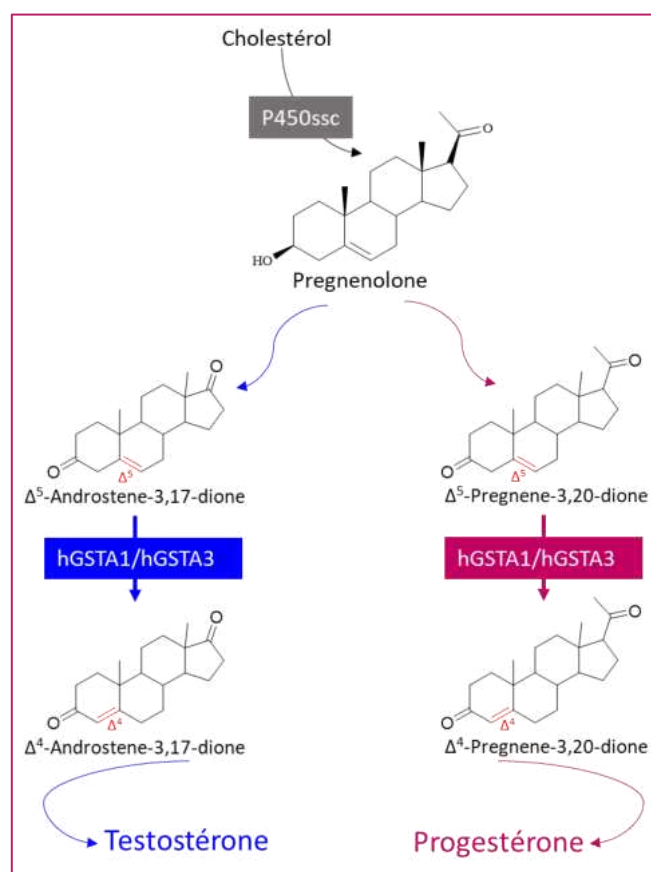


Figure 79 : Deux voies biosynthétiques menant à la testostérone et à la progestérone, avec une isomérisation  $\Delta^5$ - $\Delta^4$  pour les substrats 3-céto-stéroïdiens catalysée par hGSTA1 et hGSTA3.



L'équipe de Beng Mannervik a largement exploré le mécanisme catalytique de l'isomérisation des stéroïdes par les hGSTA. À travers des études de modélisation moléculaire et des expériences de co-cristallisation de la GSTA3 avec le GSH et le  $\Delta^5$ -androstène-3,17-dione, ils ont montré que le résidu Tyrosine 9 (Tyr9) et le GSH catalyse le transfert de proton de l'atome C4 du  $\Delta^5$ -AD vers l'atome C6 du  $\Delta^5$ -AD (Johansson et al. 2002; Tars et al. 2010), avec une barrière énergétique de  $15,8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Dourado et al. 2014). Le GSH joue un double rôle : il agit comme une base de Brønsted en abstrait l' $\text{H}_\beta$  du stéroïde via le thiolate (Tars et al. 2010), et il stabilise également la charge négative sur l'oxygène en position C3 de l'intermédiaire énolate par une forte liaison hydrogène ionique avec l'amide de la chaîne principale du GSH-Gly. De plus, la Tyr9, en plus de son rôle primaire dans la réduction du pKa qui favorise la formation de l'anion thiolate ( $\text{GS}^-$ ), contribue indirectement à la catalyse de l'isomérisation du stéroïde en facilitant le transfert de proton du GSH vers l'atome de carbone C6 par un réarrangement conformationnel (Dourado et al. 2014) (Figure 80).

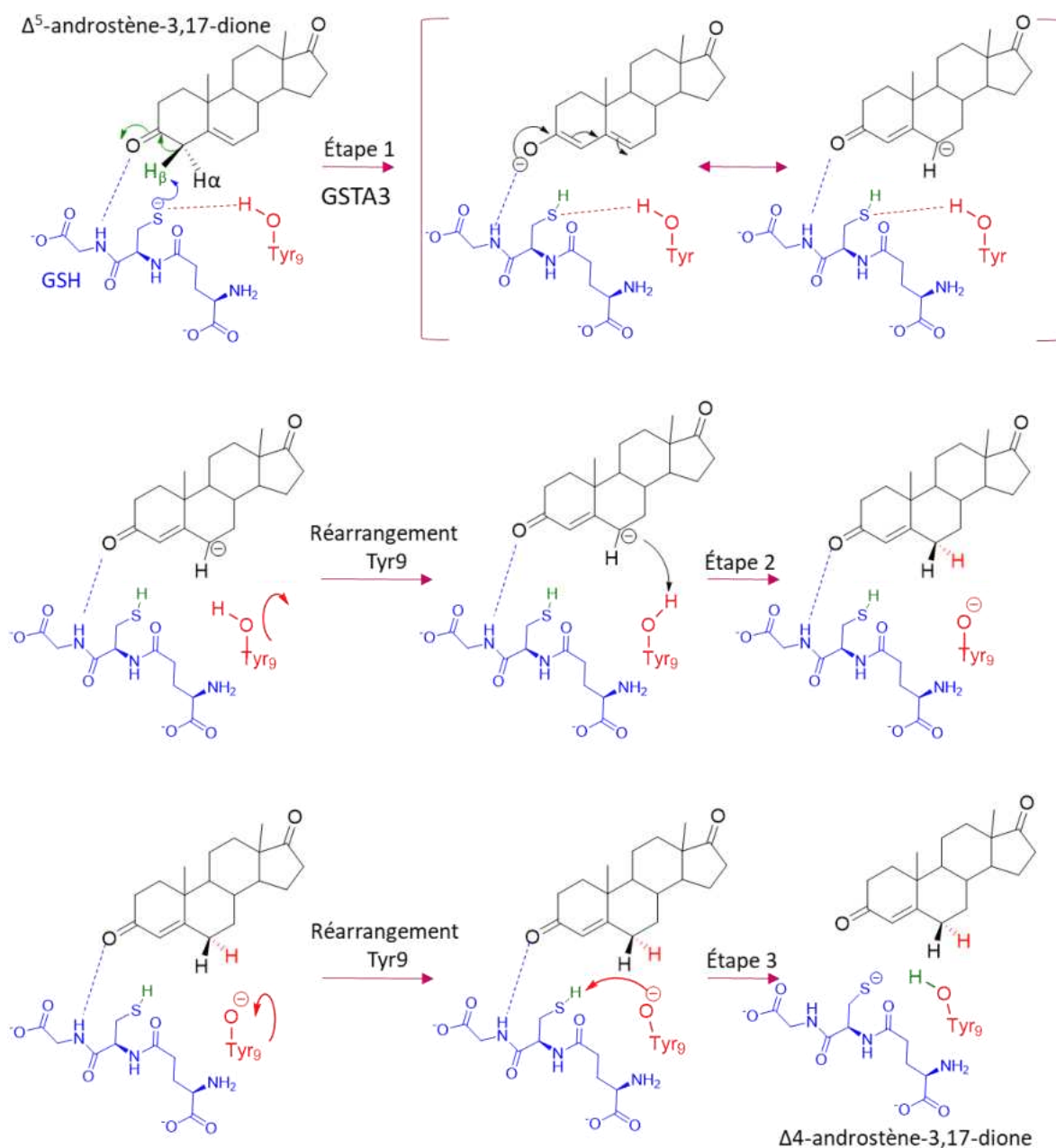


Figure 80 : Mécanisme plausible proposé de l'isomérisation du  $\Delta^5$ -AD catalysé par la hGSTA3. Ce mécanisme se compose de trois étapes catalytiques distinctes et de deux réarrangements conformationnels de la tyrosine 9, selon les travaux de Bengt et son équipe (Dourado et al. 2014).

Un autre exemple de l'implication des hGSTA1 dans la glutathionylation d'un noyau stéroïdien est celui de l'inhibiteur d'aromatase, l'exemestane (EXE) (S. Luo et al. 2018), possédant trois insaturations au niveau des positions C1 ( $\Delta^1$ ), C4 ( $\Delta^4$ ), et C6 ( $\Delta^6$ ). La conjugaison de l'EXE avec le GSH par la hGSTA1 se produit de manière régiosélective au niveau de l'insaturation  $\Delta^6$  en position C6, conduisant stéréo-sélectivement au 6 $\alpha$ -EXE-SG et non du 6 $\beta$ -EXE-SG (Teslenko et al. 2021). Le conjugué glutathionylé est ensuite métabolisé par la  $\gamma$ -glutamyl transférase (GGT), qui élimine le groupe  $\gamma$ -glutamyl, puis par la dipeptidase, qui enlève le groupe glycyl,

ce qui aboutit à la formation d'un conjugué de cystéine qui est rapidement excrété (S. Luo et al. 2018; Teslenko et al. 2021) (Figure 81).

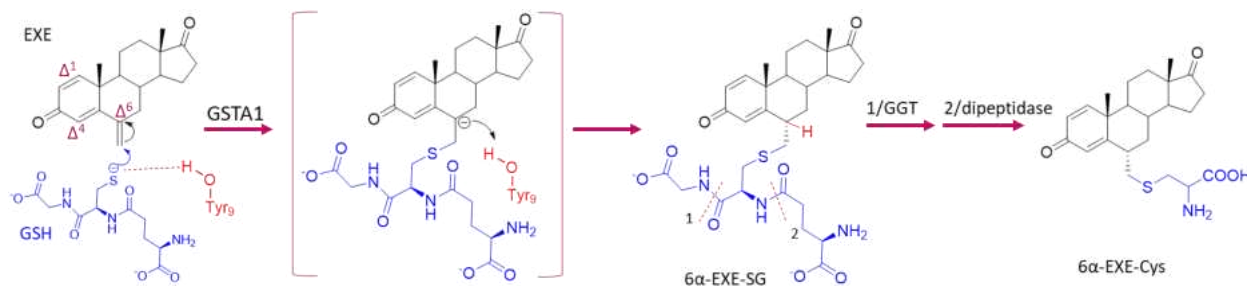


Figure 81 : Schéma du métabolisme de l'Exemestane (EXE): proposition du mécanisme de glutathionylation par la GSTA1 et clivage par la GGT et la dipeptidase

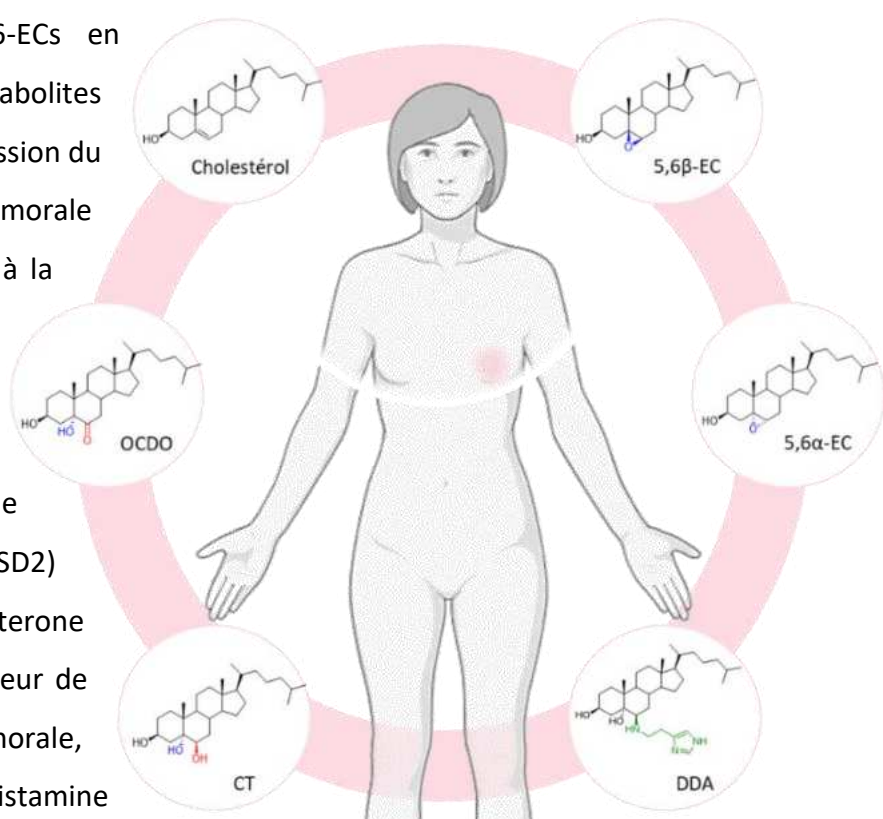
Ces exemples démontrent que la hGSTA1 est capable de se lier à des composés stéroïdiens et de catalyser leur conjugaison au GSH ou d'apporter des modifications structurales. Compte tenu de l'importance des hormones stéroïdiennes dans la régulation des fonctions mammaires, les GSTA1 pourraient jouer un rôle similaire dans le sein en produisant la DDA et/ou la DDC par la conjugaison du 5,6α-EC avec l'histamine ou le GSH, respectivement. Cette hypothèse a été en partie testée dans l'étude qui fait l'objet de l'article 3.

## 8. Hypothèses de travail

Le cholestérol, une molécule lipidique essentielle pour de nombreux processus biologiques, et est sujet à diverses modifications métaboliques qui influencent sa fonction et ses effets dans l'organisme. Parmi ces modifications, l'oxydation du cholestérol donne naissance à une série de dérivés appelés oxystérols, dont les 5,6-époxycholestanol (5,6-ECs), qui jouent un rôle crucial dans diverses voies métaboliques. Les 5,6-ECs, issus de la mono-oxygénation du cholestérol au niveau de la double liaison en C5-C6, existent sous forme de deux diastéréoisomères : le 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -époxycholestanol (5,6 $\alpha$ -EC) et le 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -époxycholestanol (5,6 $\beta$ -EC). L'équipe de Marc Poirot et Sandrine Silvente-Poirot a caractérisé une nouvelle branche métabolique centrée sur les 5,6-ECs en

mettant en évidence que ces métabolites jouent un rôle central dans la progression du cancer mammaire. En situation tumorale leur métabolisme ultérieur conduit à la formation du cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT) par la cholesterol-5,6-epoxyde hydrolase (ChEH) qui sous l'action de la 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 $\beta$ -HSD2) conduit à la formation de l'Oncosterone (OCDO), un oncométabolite promoteur de cancers du sein. En situation non-tumorale,

le 5,6 $\alpha$ -EC est conjugué à l'histamine conduisant à la production d'un suppresseur de tumeur, la Dendrogénine A (DDA). La biosynthèse de la DDA se produit par voie enzymatique nécessitant l'action d'une enzyme spécifique, dont l'identité n'a pas encore été déterminée. La voie métabolique des oxystérols comprend des processus de sulfatation catalysés par la sulfotransférase SULT2B1b. Cette enzyme est essentielle pour moduler l'activité de certains oxystérols en les transformant en composés sulfatés bioactifs ou en jouant un rôle dans la détoxification et l'inactivation de certains oxystérols cytotoxiques. L'implication de cette voie métabolique dans la conversion du CT en cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -O-sulfate (CDS) sera évaluée en étudiant l'impact de cette



modification sur la voie métabolique conduisant à la production de l'OCDO. Parallèlement, une autre voie métabolique des oxystérols implique leur hydroxylation en position C27 par la cholestérol 27-hydroxylase (CYP27A1). Cette enzyme, reconnue pour son large spectre de substrat, contribue à réduire la toxicité cellulaire de certains oxystérols cytotoxiques. L'étude de la capacité du CYP27A1 à catalyser l'hydroxylation d'autres oxystérols, comme l'OCDO et ses précurseurs, pourrait offrir de nouvelles perspectives sur son rôle dans la régulation du métabolisme de ces oxystérols et dans le processus tumoral.

Ces données nous ont conduits à formuler les hypothèses de travail suivantes :

### 8.1. Hypothèse 1 : Synthèse et évaluation des propriétés biologiques d'un analogue non-hydrolysable du CDS

**Hypothèse :** Pour évaluer l'effet biologique du CDS dans les cellules tumorales mammaires, nous proposons de synthétiser un analogue du CDS : le Cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -Diol-3 $\beta$ -SulfoNate (CDSN) qui ne sera pas hydrolysable par la stéroïde sulfatase (STS) et permettra d'étudier les propriétés biologiques correspondantes au CDS.

### 8.2. Hypothèse 2 : Métabolisme de l'OCDO et de ses précurseurs par le CYP27A1

**Hypothèse :** Le CYP27A1 pourrait être impliqué dans le métabolisme de l'OCDO et pourrait également intervenir dans la transformation de ses précurseurs, les 5,6-ECs et le CT. Nous synthétiserons les formes 27-hydroxylées de l'OCDO et de ses précurseurs, Nous étudierons le métabolisme de l'OCDO et de ses précurseurs dans des cellules cancéreuses exprimant ou non le CYP27A1 et déterminerons par des approches pharmacologiques et génétiques l'implication du CYP27A1 dans le métabolisme de ces molécules. Nous déterminerons les conséquences éventuelles de l'hydroxylation en C27 sur l'activité proliférative de l'OCDO.

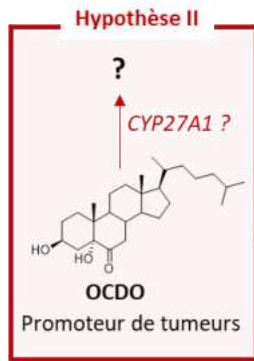
### 8.3. Hypothèse 3 : Catalyse de la conjugaison entre le 5,6 $\alpha$ -EC et l'histamine par la hGSTA1

**Hypothèse :** La glutathion S-transferase A1 de rat (rGSTA1) catalyse la conjugaison du glutathion sur le 5,6 $\alpha$ -EC de manière regio- et stéréosélective pour donner un produit de stéréochimie analogue à celui de la DDA. De façon similaire, nous postulons que la hGSTA1 pourrait catalyser la conjugaison du 5,6 $\alpha$ -EC avec l'histamine pour produire la DDA. Nous apporterons des données cliniques, biochimiques, pharmacologiques, structurales et physiopathologiques afin de tester cette hypothèse.

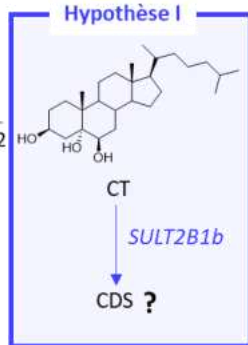
START  
2021

QUESTIONS ?

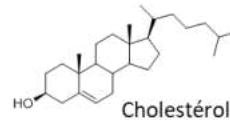
L'OCDO, substrat du CYP27A1 ?



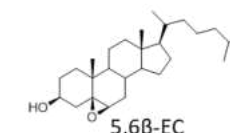
Quelles sont les propriétés  
biologiques du CDS ?



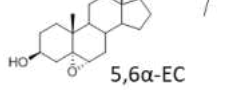
11 $\beta$ -HSD2



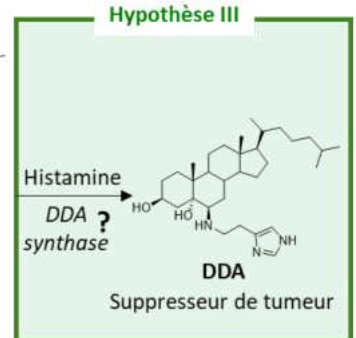
Quelle est l'enzyme responsable de la  
biosynthèse de la DDA (DDAS) ?



ChEH



5,6-epoxycholestérol





## RESULTATS



## Article 1

### Synthèse chimique et propriétés biochimiques du cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3-sulfonate : un analogue non hydrolysable du cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -sulfate

Philippe de Medina<sup>1</sup>, Silia Ayadi<sup>1</sup>, Régis Soulés, Bruno Payre, Sandrine Rup-Jacques, Sandrine Silvente-Poirot, Mohammad Samadi, Marc Poirot.

<sup>1</sup>co-premiers auteurs

(Article publié, DOI: [10.1016/j.jsbmb.2023.106396](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2023.106396))

#### Introduction

Les oxystérols sont des produits d'oxydation du cholestérol, et se distinguent par la présence d'un ou de plusieurs groupements chimiques supplémentaires contenant un atome d'oxygène. Parmi eux, les 5,6-époxycholestérols (5,6-ECs) proviennent de la mono-oxygénation du cholestérol au niveau de l'insaturation en position C5-C6, se présentant sous la forme de deux diastéréoisomères distincts : le 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -époxycholestanol (5,6 $\alpha$ -EC) et le 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -époxycholestanol (5,6 $\beta$ -EC) (Poirot et Silvente-Poirot 2013c). Dans cette voie, le cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT), est un métabolite formé par l'hydratation des 5,6-ECs, catalysée par la cholestérol-5,6-époxyde hydrolase (ChEH) (Philippe De Medina et al. 2010b). Dans les cancers du sein (CS), le CT est métabolisé en oncostérone (OCDO) par la 11 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 $\beta$ -HSD2), un oncométabolite promoteur de tumeurs dans le CS (Voisin et al. 2017). Une voie de transformation potentielle des oxystérols a été identifiée avec la découverte que la SULT2B1b, une enzyme de la famille des sulfotransférases cytosoliques SULT2, possède une affinité particulière pour le cholestérol (Norman B Javitt et al. 2001). Cette enzyme catalyse le transfert du groupement sulfonate (SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) du donneur universel de sulfonate, le 3'-phosphoadénosine, 5'-phosphosulfate (PAPS) (C. N. Falany 1997), vers l'oxystérol accepteur en position 3 $\beta$ -hydroxy du cycle A du noyau stéroïdien (Fuda et al., 2007). L'équipe a montré que la cytotoxicité du tamoxifène (Tam) dans des cellules de CS était médiée par le 5,6 $\alpha$ -époxy-cholestérol-3 $\beta$ -sulfate (5,6-ECS) via un mécanisme dépendant du LXR $\beta$ , et que la sulfonation du 5,6 $\alpha$ -EC en 5,6-ECS était catalysée par la SULT2B1b. Ces résultats suggèrent que la SULT2B1b pourrait jouer un rôle dans les effets anti-tumoraux du Tam dans les cellules du CS (Segala et al. 2013). Un autre métabolite sulfaté bioactif identifié est celui formé par la sulfatation du 25-Hydroxycholestérol en 25-Hydroxycholestérol-3 $\beta$ -sulfate (25-HCS), actuellement en [phase II](#) d'essais cliniques pour

explorer son potentiel dans le traitement de maladies hépatiques, comme la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD) (Ren et al. 2007; 2014). La sulfatation joue également un rôle majeur dans l'inactivation des oxystérols cytotoxiques, ceci est le cas du 7-Céto-cholestérol (7-KC). Les cellules exprimant l'enzyme SULT2B1b sont plus résistantes à la toxicité du 7-KC que celles qui ne l'expriment pas et la sur-expression de la SULT2B1b dans ces dernières favorise la conversion du 7-KC en 7-KCS, diminuant ainsi sa toxicité (Fuda et al., 2007). Le CT, oxystérol également hydroxylé au niveau du noyau B du noyau stéroïdien peu subir une sulfatation pour former le cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -O-sulfate (CDS), métabolite qui a été détecté dans les lignées cancéreuses mammaires exprimant l'enzyme SULT2B1b (Segala et al. 2013). Le CDS a été suspecté dans l'étude de Song ayant des propriétés antagonistes des récepteurs LXRs sur un gène rapporteur (Ching Song, Hiipakka, et Liao 2001). Cependant, les études sur ses propriétés biologiques sur les cellules cancéreuses mammaires n'ont pas été menées en raison de son hydrolyse rapide par la stéroïde sulfatase (STS) (Segala et al. 2013; Mueller et al. 2015). Cette enzyme, qui est largement exprimée dans les tissus humains (Warren et French 1965) et sur-exprimée dans les cancers mammaires (Utsumi et al. 2000; Selcer et al. 2007), rend difficile l'étude des effets biologiques des stéroïdes monosulfatés en les hydrolysant rapidement (I. T. Cook et al. 2009) sous leur forme libre active (Falany & Falany, 2007). Cependant, il est possible de conférer aux molécules sulfatées une résistance à l'action de la STS en modifiant chimiquement leurs groupes fonctionnels (Falany et al. 2007). Cette approche constitue une stratégie afin de contourner les limitations biologiques imposées par l'hydrolyse rapide du CDS, permettant ainsi l'évaluation de ses propriétés biologiques. De plus, le CT a été identifié comme un biomarqueur dans la maladie de Niemann-Pick de type C (NPC), une maladie neurodégénérative rare progressive, causée par des mutations des gènes *NPC1* et *NPC2*. Ce trouble est caractérisé par une accumulation anormale de cholestérol non estérifié dans le système endo-lysosomal tardif de la cellule (Pajares et al. 2015; F. D. Porter et al. 2010). Cette accumulation pourrait également indiquer une métabolisation excessive du CT accumulé en CDS, dont les effets biologiques restent encore inconnus.

## Démarche

Afin d'évaluer les propriétés biologiques du CDS, nous avons synthétisé un analogue non-hydrolysable de celui-ci. En effet, l'approche consiste à substituer l'oxygène du groupement sulfate ( $R-O-SO_3^-$ ) du substrat CDS par un sulfonate ( $R-SO_3^-$ ) conduisant au Cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -Diol-3 $\beta$ -SulfoNate (CDSN). Cette modification permet d'empêcher l'hydrolyse par l'enzyme STS en neutralisant le site de clivage. Cette approche a déjà été démontrée comme efficace pour les hormones stéroïdiennes (Pui-Kai Li et al. 1993) et a également été rapportée dans une étude récente sur les disaccharides (El-Abid et al. 2024). Dans ce travail, nous rapportons la synthèse du CDSN, un analogue non-hydrolysable du CDS. Nous décrivons également quelques tests cellulaires qui nous ont permis de montrer que cette molécule est biologiquement active suggérant que le CDS pourrait potentiellement l'être également.

Nous avons également procédé à la synthèse des composés radiomarqués nécessaires pour cette étude : le [ $^{14}C$ ]-5,6 $\alpha$ -EC, le [ $^{14}C$ ]-5,6 $\beta$ -EC, le [ $^{14}C$ ]-OCDO et le [ $^{14}C$ ]-CT, ainsi que leur forme non radiomarqué. Pour notre étude, nous avons sélectionné deux lignées cellulaires distinctes :

- **MCF-7** (Michigan Cancer Foundation) : lignées cellulaires de cancer mammaire (ER $\alpha$ +), exprimant les enzymes 11 $\beta$ -HSD2 (Voisin et al. 2017) et l'enzyme SULT2B1b (Fuda et al. 2007; Segala et al. 2013).
- **HEK293T** (Human Embryonic Kidney) 293T : Une lignée cellulaire immortalisée dérivée de cellules de rein embryonnaire humain, qui, contrairement aux cellules MCF-7, ne possède ni l'enzyme SULT2B1b (Fuda et al. 2007) ni la 11 $\beta$ -HSD2 (Voisin et al. 2017). Cependant, les cellules HEK293T présentent l'avantage d'être facilement transfectées, avec une haute capacité d'expression et une stabilité durable des protéines exprimées. Ces cellules ont été transfectées avec le plasmide codant pour la 11 $\beta$ -HSD2 qui sera la source de lysat HEK293T-11 $\beta$ -HSD2.

Étant donné que le CT est le précurseur du promoteur de tumeur l'OCDO produit par la 11 $\beta$ -HSD2 dans les cellules cancéreuses mammaires (Voisin et al. 2017), nous avons étudié l'impact du CDSN sur la production d'OCDO sur cellule entière MCF-7 ainsi que sur lysat cellulaire HEK293T-11 $\beta$ -HSD2 directement au niveau enzymatique. Les résultats issus de ces deux approches nous ont conduits à comparer et d'évaluer l'effet du CDSN seul, ainsi que de son

effet en combinaison avec des composés affectant l'homéostasie du cholestérol et l'accumulation de stérols au niveau cellulaire. Nous avons également étudié l'impact de ces conditions sur la prolifération et la viabilité des cellules cancéreuses mammaires en culture.



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

## Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jsbmb](https://www.elsevier.com/locate/jsbmb)



# Chemical synthesis and biochemical properties of cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3-sulfonate: A non-hydrolysable analogue of cholestane- 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -sulfate

Philippe de Medina <sup>a,b,c,\*</sup>, Silia Ayadi <sup>a,b,1</sup>, Régis Soules <sup>a,b,c</sup>, Bruno Payre <sup>d</sup>,  
Sandrine Rup-Jacques <sup>e</sup>, Sandrine Silvente-Poirot <sup>a,b,c,\*</sup>, Mohammad Samadi <sup>e,\*\*</sup>,  
Marc Poirot <sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Inserm, CNRS, University of Toulouse, Team INOV: Cholesterol Metabolism and Therapeutic Innovations, Toulouse, France

<sup>b</sup> Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, France

<sup>c</sup> French network for Nutrition physical Activity And Cancer Research (NACRe network), France

<sup>d</sup> Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie, Faculté de Médecine Rangueil, Toulouse, France <sup>e</sup> Laboratory of Chemistry and Physics Multi-Scale Approach to Complex Environments, Department of Chemistry, University Lorraine, 57070 Metz, France

### ARTICLE INFO

#### Key words:

Sterols  
Oxysterol  
Oxysterol sulfate  
Cholesterol  
Uptake  
Metabolism  
Cell death MLB  
Cancer  
NPC1  
Proliferation Cell  
death  
Autophagy

### ABSTRACT

Cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT) is a primary metabolite of 5,6-epoxycholesterols (5,6-EC) that is catalyzed by the cholesterol-5,6-epoxide hydrolase (ChEH). CT is a well-known biomarker for Niemann-Pick disease type C (NP-C), a progressive inherited neurodegenerative disease. On the other hand, CT is known to be metabolized by the 11 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase of type 2 (11 $\beta$ -HSD2) into a tumor promoter named oncosterone that stimulates the growth of breast cancer tumors. Sulfation is a major metabolic transformation leading to the production of sulfated oxysterols. The production of cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -O-sulfate (CDS) has been reported in breast cancer cells. However, no data related to CDS biological properties have been reported so far. These studies have been hampered because sulfate esters of sterols and steroids are rapidly hydrolyzed by steroid sulfatase to give free steroids and sterols. In order to get insight into the biological properties of CDS, we report herein the synthesis and the characterization of cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -sulfonate (CDSN), a non-hydrolysable analogue of CDS. We show that CDSN is a potent inhibitor of 11 $\beta$ -HSD2 that blocks oncosterone production on cell lysate. The inhibition of oncosterone biosynthesis of a whole cell assay was observed but results from the blockage by CDSN of the uptake of CT in MCF-7 cells. While CDSN inhibits MCF-7 cell proliferation, we found that it potentiates the cytotoxic activity of post-lanosterol cholesterol biosynthesis inhibitors such as tamoxifen and PBPE. This effect was associated with an increase of free sterols accumulation and the appearance of giant multilamellar bodies, a structural feature reminiscent of Type C Niemann-Pick disease cells and consistent with a possible inhibition by CDSN of NPC1. Altogether, our data showed that CDSN is biologically active and that it is a valuable tool to study the biological properties of CDS and more specifically its impact on immunity and viral infection.

**Abbreviations:** 5 $\alpha$ , EC, 5,6 $\alpha$ , epoxycholesterols; 5,6 $\beta$ -EC, 5,6 $\beta$ -epoxycholesterols; 11 $\beta$ -HSD2, 11 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase of type 2; CDS, cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -O-sulfate; CDSN, cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -sulfonate; ChEH, cholesterol-5,6-epoxide hydrolase; CT, cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol; Ez, Ezetimibe; NPC, Niemann-Pick type C; OCDO, oncosterone, 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol.

\* Corresponding authors at: Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Inserm, CNRS, University of Toulouse, Team INOV: Cholesterol Metabolism and Therapeutic Innovations, Toulouse, France

\*\* Correspondence to: Laboratory of Chemistry and Physics Multi-Scale Approach to Complex Environments, Department of Chemistry, University Lorraine, Metz, France.

E-mail addresses: [philippe.de-medina@inserm.fr](mailto:philippe.de-medina@inserm.fr) (P. de Medina), [sandrine.poirot@inserm.fr](mailto:sandrine.poirot@inserm.fr) (S. Silvente-Poirot), [mohammad.samadi@univ-lorraine.fr](mailto:mohammad.samadi@univ-lorraine.fr) (M. Samadi), [marc.poirot@inserm.fr](mailto:marc.poirot@inserm.fr) (M. Poirot).

<sup>1</sup> these authors contribute equally to this work <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2023.106396>

Received 30 June 2023; Received in revised form 22 August 2023; Accepted 4 September 2023

Available online 6 September 2023

## 1. Introduction

Oxysterols (OS) represent an expanding family of bioactive oxygenated cholesterol metabolites that impact on a plethora of diseases including atherosclerosis, cancer, neurodegenerative diseases and aging [1,2]. Depending on their chemical structures, these metabolites can exert their biological properties through various molecular mechanisms that could involve either nuclear receptors (e.g., LXR, ROR, ER $\alpha$ , GR) [3–6], G-protein coupled receptors (e.g., SMO, CXCR2, EBI2) [7–11], enzymes (e.g., SOAT/ACAT, ChEH and HMGCoA reductase) [12–15] or transporters (e.g., ions transporters, INSIG, oxysterol binding proteins, NPC1 and NPC1L1) [16–21]. Cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT) and its obligatory precursors 5,6-epoxycholesterols (5,6-ECs) [22] occupy an important place among the oxysterol family, because 5,6-EC are among the major OS found in processed food and in circulating blood [4,15,23]. In addition CT is a biomarker of several pathologies such as Niemann-Pick type C (i.e., an inherited neurodegenerative disease), allergic asthma and potentially breast cancers [24–26], and a potential marker of other diseases [27–31]. Looking at the biological properties of CT, both beneficial and deleterious effects have been reported. For example, CT displays antiproliferative, cytotoxic and mutagenic activities and promote vascular smooth muscle cells calcification, a process associated with atherosclerosis [32,33]. On the other hand, this OS acts as a neuroprotectant and an anti-epileptic agent [34,35]. Although CT can be formed through the acidic hydrolysis of 5,6-epoxycholestan-3 $\beta$ -ol (5,6-ECs) in strong acidic conditions, in mammalian tissues their hydrolysis requires the obligatory intervention of a microsomal enzyme: the cholesterol-5,6-epoxide hydrolase (ChEH) [14], indeed, the epoxide ring of 5,6-EC was surprisingly found extremely stable towards the attack of nucleophilic compounds by contrast with other aliphatic epoxides [23,36]. Interestingly, in cancer, CT was shown to be oxidized by the 11 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase of type 2 (11 $\beta$ -HSD2) to form an oncometabolite named oncosterone, that promotes breast cancer (BC) proliferation and invasiveness both in vitro and in vivo [3,22,37]. CT was also shown to be sulfated in cells by the sulfotransferase SULT2B1b leading to the production of cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -sulfate (CDS) [38–40]. While genetic evidences supported an inactivation of steroids and sterols through sulfation [41,42], other data evidenced that sulfation generates biologically active signaling molecules. Cholesterol sulfate was shown to be important in keratinocyte physiology [43] and to control tumor infiltration of T cells [44]. The sulfation of side chain OS led to compounds that display trophic and proliferative properties [45]. B-ring oxysterols led to the production of LXR antagonists on a gene reporter assay [46]. Interestingly the sulfated form of 5,6 $\alpha$ -EC was shown to control BC cell differentiation and death [39,47]. The 25-hydroxycholesterol-3-sulfate, a sulfated side chain oxysterol, was shown to be an epigenetic regulator that activates fatty acid oxidation, and this compound is under clinical evaluation for the treatment of Non-Alcoholic Steatohepatitis and Alcoholic Hepatitis [48–50]. In addition, the expression of SULT2B1b in tumors inhibits tumor growth and restore

studies aiming to evaluate the biological properties of CDS have never been reported to date. Studies on CDS have been hampered because sulfated (oxy)sterols are rapidly hydrolyzed by the steroid sulfatase (STS) which is widely expressed in various tissues and cancer cells (Fig. 1A) [39,52].

To circumvent this problem, we decided to synthesize a non-hydrolysable analogue of CDS. The strategy to produce a non-hydrolysable CDS analogue is by removing the oxygen in 3 $\beta$  position of steroid backbone involved in the esterification to eliminate the point of cleavage by STS (Fig. 1) as previously reported for estrone sulfate [53], and we report herein for the first time the chemical synthesis of cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -sulfonate (CDSN) (Fig. 1B) as a stable and non-hydrolysable chemical analogue of CDS. We evaluate the impact of CDSN on BC cells on the biosynthesis of oncosterone, on the cellular uptake of several OS and on cell fate.

## 2. Experimental section

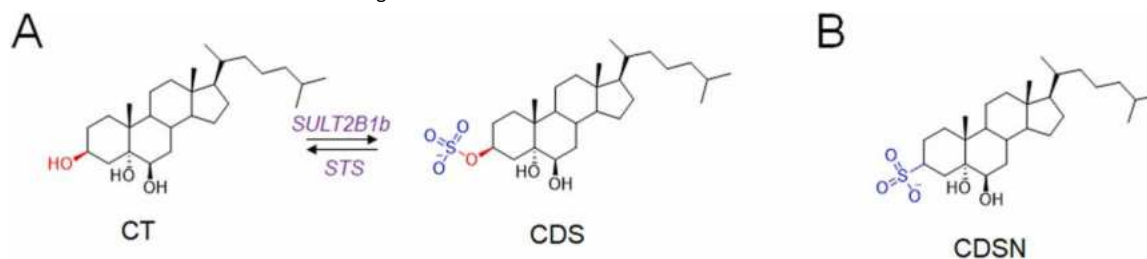
### 2.1. General

All reagents were obtained from commercial suppliers and used without further purification. PBPE (1-[2-(4-benzylphenoxy)ethyl]pyrrolidine) was produced as reported before [54]. Flash chromatography was carried out using silica gel (Merck Kieselgel 60, 230–400 mesh). Thin layer chromatography (TLC) analyses were performed on thin-layer analytical plates 60 F<sub>254</sub> (Merck). Melting points were measured on a Stuart melting point apparatus SMP30. Infrared (IR) spectra were recorded on a Nicolet iS5 FT-IR spectrometer. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded with a Bruker AvanceNeo 400 spectrometer and are shown on the Supplementary material section.

### 2.2. Chemical synthesis of cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -sulfonate (CDSN)

**Thiocholesterol (4):** Thiocholesterol was prepared according to the procedure described by King and al [36], from cholesterylisothiuronium *p*-toluenesulfonate [55] **2** (2.156 g, 3.5 mmol). The solid crude product was purified over silica gel using hexane as eluent to yield **4** as a white solid (1.210 g; 86 %). mp 95.5 °C (lit [36] 97.5 °C). IR (neat)  $\nu$ : 2930, 2899, 2865, 2849, 1465, 1375 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.31 (m, 1 H, H-6), 2.69 (m, 1 H, H-3), 2.31 (m, 2 H, H-5), 1.00 (s, 3 H, 19-CH<sub>3</sub>), 0.91 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H, 21-CH<sub>3</sub>), 0.86 (dd, *J* = 6.6, 1.8 Hz, 6 H, 26-CH<sub>3</sub> and 27-CH<sub>3</sub>), 0.67 (s, 3 H, 18-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  142.06, 121.19, 56.90, 56.30, 50.35, 44.36, 42.45, 40.08, 39.90, 39.67, 39.60, 36.49, 36.34, 35.94, 34.23, 31.95 (CH<sub>2</sub>), 31.95 (CH), 28.38, 28.17, 24.42, 23.98, 22.97, 22.71, 21.05, 19.48, 18.87, 12.00. the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data were identical to that reported in lit [38] MS (EI, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): *m/z*: 402 ([M]<sup>+</sup>, 43 %).

**5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -dihydroxy-cholesteryl sulfonate (5):**



**Fig. 1.** A) The reaction of sulfation of cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT) is catalyzed by the sulfotransferase SULT2B1b to give cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -sulfate (CDS). The desulfation of CDS is catalyzed by the steroid sulfatase (STS). B) Chemical structure of cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -sulfonate (CDSN), a non-hydrolysable analogue of CDS.

antitumor immune response highlighting the implication of a SULT2B1/LXR pathway potentially involving yet unidentified sulfated OS [51]. We previously reported that the sulfated metabolite of CT (cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -sulfate; CDS; Fig. 1A) is produced in breast cancer cells highlighting that this compound is a metabolite and a modulator of LXR signaling [39]. Despite this observation,

**Method A:** A solution of 35 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 ml) was dissolved in 98% formic acid (4 ml) at 0 °C and the mixture was stirred at rt for 1 h to afford peroxyformic acid. To this was added a solution of thiocholesterol **4** (1 mmol, 402 mg) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) at 0 °C. The reaction was stirred at rt overnight. The reaction content was transferred to a 250 ml flask and the solvent was

carefully (foam formation) evaporated below 25 °C and dried under vacuum. The residue was dissolved with 20 ml of MeOH and heated at 60 °C in a water-bath for 1 h. The solvent was evaporated and purified on silica gel using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (80–20 then 70–30) to yield **5** as a white solid (446 mg; 92%),

**Method B:** A solution of 35 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 ml) was dissolved in 98% formic acid (1 ml) at 0 °C and the mixture was stirred at rt for 1 h to afford peroxyformic acid. To this was added a solution of thiocholesterol **4** (1 mmol, 402 mg) in THF (8 ml) at 0 °C and stirred at rt for 1 h. The solution was warmed to 50–60 °C in a water-bath for 3 h and stirred at rt overnight. The solvent was evaporated and treated as described above to yield **5** as a white solid (460 mg; 95%), mp 275.3 °C. IR (neat)  $\nu$ : 3404, 2932, 2866, 1228, 1164, 1048 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, MeOD)  $\delta$  3.49

(d,  $J$  = 3.4 Hz, 1 H, H-6), 3.20 (tt,  $J$  = 12.5, 4.5 Hz, 1 H, H-3), 2.37 (t,  $J$  = 13.1 Hz, 1 H, 2-Hax), 1.15 (s, 3 H, 19-CH<sub>3</sub>), 0.94 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3 H, 21-CH<sub>3</sub>), 0.88 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 6 H, 26-CH<sub>3</sub> and 27-CH<sub>3</sub>), 0.71 (s, 3 H, 18-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, MeOD)  $\delta$  76.42, 75.37, 57.67, 57.51, 56.14, 46.66, 43.89, 41.49, 40.70, 39.35, 37.38, 37.15, 35.45, 34.10, 33.62, 31.63, 29.34, 29.14, 25.19, 24.94, 23.41, 23.20, 22.95, 22.08, 19.24, 17.00, 12.61.

## 2.3. Cell culture

MCF7 cells were chosen because they express a functional SULT2B1b enzyme [39]. HEK293T cells were chosen for transfection assays and overexpression of HSD11B2 as reported in [56]. MCF-7 and HEK293T cells were from the American Tissue Culture Collection and cultured until passage 30. MCF-7 cells were grown in RPMI 1640 supplemented with 5 % fetal bovine serum (FBS). HEK293T cells were grown in DMEM 10 % FBS. All media were supplemented with penicillin and streptomycin (50 U/ml). Cells were cultured in a humidified atmosphere with 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C. Cell lines were tested once a month for mycoplasma contamination using Mycoalert Detection (Lonza).

## 2.4. Measure of sterol metabolism in MCF-7 Cells

We have used MCF-7 cells for whole cell oncosterone biosynthesis assays from [<sup>14</sup>C]-CT as described before [37]. MCF-7 cells were plated into six-well plates (1.5 × 10<sup>5</sup> cells per well) in the appropriate complete medium. Two days after seeding, this medium was replaced with complete medium and cells were treated with 1 μM [<sup>14</sup>C]-CT (26 mCi/mmol; 0.052 μCi/well) for 5 h in the presence or absence of CDSN at 20 μM. After incubation, cells were washed and scraped, and neutral lipids were extracted with a chloroform-methanol mixture as described previously and then separated by TLC using either ethyl acetate as the eluent [57]. The radioalabeled sterols were revealed by autoradiography. For quantification, silica zones at the expected R<sub>f</sub> values corresponding to authentic [<sup>14</sup>C]-labeled standards were scraped and radioactivity was measured using a β-counter.

## 2.5. Cell transfection

HEK-293 T cells (5.10<sup>6</sup>) were transfected with 5 μg of the plasmid pCMV6-XL5 HSD2 (SC122552, OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) using the Neon Transfection System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with 2 pulses at 1300 V for 20 ms. 48 h after transfection, the media was replaced by DMEM without phenol red supplemented with 10 % dextran-coated charcoal-stripped FBS. Cells were harvested 72 h after transfection, washed with PBS and stored at – 80 °C.

## 2.6. Measure of oncosterone biosynthesis inhibition by CDSN

We have chosen to test the cell lysate from HEK293T cells transfected with a plasmide encoding 11β-HSD2 to measure the impact of inhibitors of

oncosterone biosynthesis from [<sup>14</sup>C]-CT at the enzyme level [37]. Cell lysates were prepared from HEK293T cells transiently expressing human 11β-HSD2 as described before [37]. Briefly, 2.10<sup>6</sup> cells were resuspended in 150 μL of activity buffer (Tris-HCl 25 mM PH 7.4, glycerol 20%, sucrose 25 mM, NaCl 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM) with 1% protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich). Cells were lysed by four cycles of freeze/thaw (nitrogen-rt) and samples were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was collected, aliquoted and stored at – 80 °C before use. Protein concentration was measured using the Bradford method. The enzymatic activity was measured in an 11β-HSD2 activity buffer (final volume 0.2 ml) containing the substrate ([<sup>14</sup>C]-CT (1 μM), cell lysate proteins (20 μg), NAD<sup>+</sup> (0.5 mM) and DMSO 1 % in the absence or presence of the tested compounds. After 10 min of incubation at 37 °C, the reaction was stopped by immersing the sample in ice-water and adding 1.5 ml chloroform/methanol (2:1) and 300 μL of aqueous KCl (8.8 %). The organic layer was washed with water (1 ml) and reduced to dryness under a flux of nitrogen. Lipids were then separated by TLC using either ethyl acetate as the eluent. The radioactive sterols were revealed by autoradiography. For quantification, silica zones at the expected R<sub>f</sub> values corresponding to authentic [<sup>14</sup>C]-labeled standards were scraped and radioactivity was measured using a β-counter (tri-carb; Perkin-Elmer). 2.7. Uptake of cholesterol, 5,6-ECs, and CT

MCF-7 cells were plated into twelve-well plates (7.5 × 10<sup>4</sup> cells per well) in the appropriate complete medium. Four days after seeding, the medium was replaced with 5 % FBS medium or medium without FBS and cells were incubated with [<sup>14</sup>C]-cholesterol, [<sup>14</sup>C]- 5,6α-EC, [<sup>14</sup>C]- 5,6β-EC or [<sup>14</sup>C]-CT (1 μM; 26 mCi/mmol; 0.026 μCi/well) in the presence or absence of 40 μM Ezetimibe (Ez) (Sigma-Aldrich) or 20 μM of CDSN, for 5 h. Then, cells were washed with PBS and were re-suspended in 1 ml of SDS 0.1 %. Radioactivity was measured using a β-counter (tri-carb; Perkin-Elmer).

## 2.8. Cell death assay

MCF-7 cells were seeded in RPMI with 5 % FBS into 6-well plates at 1.5 × 10<sup>5</sup> cells per well. The cells were then treated with solvent vehicle (0.1 % ethanol/0.1 % DMSO), 2.5 μM Tam or 10 μM PBPE alone or in the presence of 10 μM CDSN. Cell death was determined by the Trypan blue exclusion assay. The cells were trypsinized and resuspended in the Trypan blue solution (0.25 % (w/v) in PBS) and counted in a Malassez cell under a light microscope. 2.9. Filipin staining procedures

Cell were grown on glass coverslips and treated with drugs for 72 h and then fixed with 3.7 % paraformaldehyde for 15 min at room temperature followed by washing twice with PBS (Euromedex), and stained with filipin (50 mg/ml) for 75 min at room temperature followed by washing twice with PBS as described before [58]. Cells were analysed using a Nikon eclipse 90i microscope. The pixel intensities of the images were measured using NIH Image software and reported on a graph as in [59].

## 2.10. Transmission electron microscopy

Cells were fixed with 2 % glutaraldehyde in 0.1 mol/L Sorensen phosphate buffer (pH 7.4) for 1 h and washed with the Sorensen phosphate buffer (0.1 mol/L) for 12 h. The cells were then postfixed with 1 % OsO<sub>4</sub> in Sorensen phosphate buffer (0.05 mol/L Sorensen phosphate buffer, 0.25 mol/L glucose, 1 % OsO<sub>4</sub>) for 1 h. The cells were then washed twice with distilled water and prestained with an aqueous solution of 2 % uranyl acetate for 12 h. Samples were then treated exactly as described previously [60].

## 2.11. Statistical analysis

Values are the mean ± S.E. of three independent experiments each carried out in duplicate. Statistical analysis was carried out using a Student's t-test for



unpaired variables. \*, \*\* and \*\*\* in the figures refer to statistical probabilities (P) of <0.05, <0.01 and <0.001, respectively, compared with control cells that received solvent vehicle alone.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Chemical synthesis of CDSN

The chemical synthesis of CDSN is shown in Fig. 2. Initially, we examined the preparation of cholesteryl sulfonate **3** by oxidation of cholesterylisothiuronium *p*-toluenesulfonate **2** [55] with performic acid according to Yoder procedure [41]. <sup>1</sup>H NMR analysis of **3** reveals the presence of *p*-toluenesulfonic acid as by product. Tentative to remove *p*-toluenesulfonic acid which accompanied compound **3**, either by crystallization or purification over silica gel was unsuccessful. To circumvent this problem, we turned to the oxidation of thiocholesterol **4**, which was prepared from **2** by alkali hydrolysis [61]. Thus, the oxidation of thiocholesterol with performic acid in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> or THF produced a mixture of **3** and the deprotected sulfonate **5**. Heating the resulting mixture at 60 °C in MeOH affect the deformylation of **3**, which is catalyzed by the sulfonic acid [62] moiety and furnished the desired 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -dihydroxy-cholesteryl sulfonate **5** (Fig. 2). In conclusion, the synthesis of 5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -dihydroxy-cholesteryl sulfonate **5** was achieved in four steps from commercially available cholesterol **1**. The facile deprotection of **3** is due to the presence of a sulfonic acid moiety, avoiding the use of a strong base (e.g. NaOH, KOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) is worthy-mentioning. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra are presented in [supplementary material](#).

#### 3.2. CDSN is an inhibitor of oncosterone biosynthesis

We have previously demonstrated that CT is metabolized toward the oncometabolite oncosterone through 11 $\beta$ -HSD2 [37]. The inhibition of oncosterone production constitutes a putative new therapeutic strategy for the treatment of BC [3,22]. Consequently, we evaluated if CDSN can inhibit oncosterone production. We evaluated the impact of CDSN on oncosterone production catalyzed by 11 $\beta$ -HSD2. The measure of the oncosterone synthase activity was carried out on cell lysate from HEK-293 T transiently transfected with a plasmid encoding the human 11 $\beta$ -HSD2 (HEK293T-11HSD2 lysate). The conversion of [<sup>14</sup>C]-CT into [<sup>14</sup>C]-Oncosterone in HEK293-11HSD2 lysate was

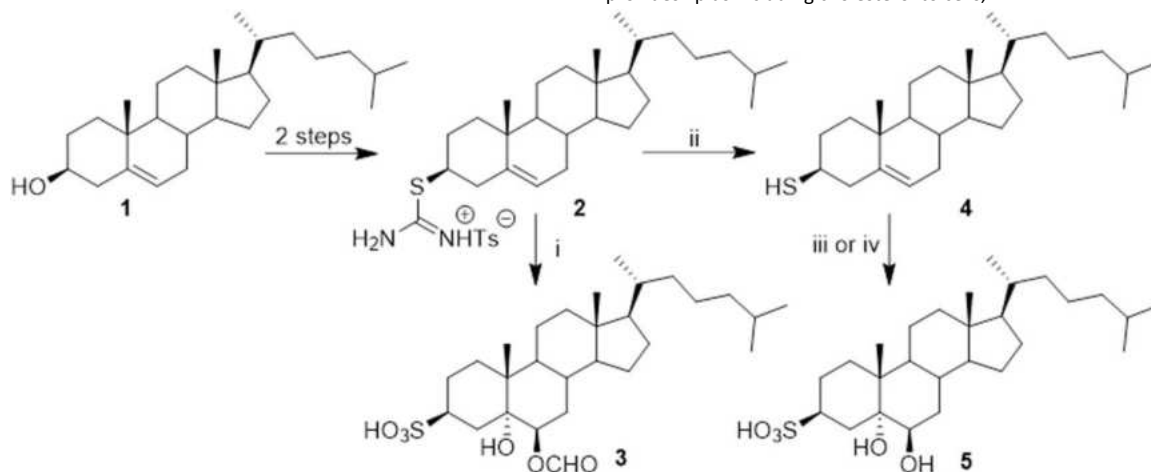
measured alone or with increasing concentrations of CDSN ranging from 1 to 10  $\mu$ M. CDSN inhibits the production of [<sup>14</sup>C]-Oncosterone from [<sup>14</sup>C]-CT in a dose-dependent manner (IC<sub>50</sub> = 2.55  $\pm$  0.63  $\mu$ M) (Fig. 3A-B). Consequently, CDSN is a potent inhibitor of oncosterone synthase activity.

#### 3.3. Impact of CDSN on CT metabolism in MCF-7 cells

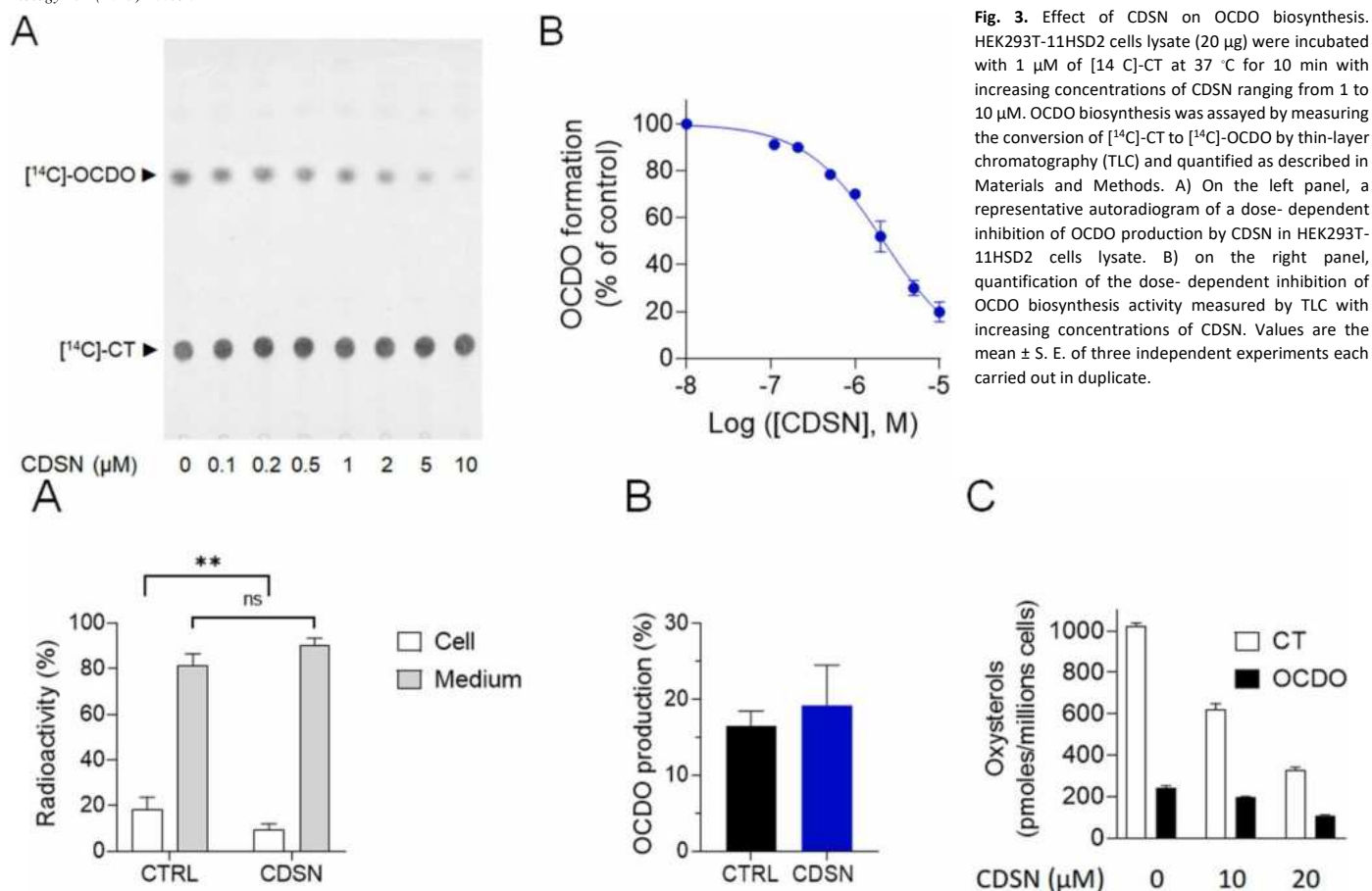
We previously reported that the human BC cell line MCF-7 cells expressed the SULT2B1b protein, produced sulfated OS [30] and responded to the stimulation of sulfated OS. We have thus chosen this cell line to study the effect of CDSN. We measured the impact of CDSN on oncosterone (OCDO) formation on a whole cell assay by incubating MCF-7 cells with [<sup>14</sup>C]-CT alone or in the presence of 20  $\mu$ M CDSN for 5 h. After 48 hr, and in the absence of CDSN, 19  $\pm$  6 % of the radioactivity was incorporated into cells (Fig. 4A). The intracellular radioactivity corresponds at 16  $\pm$  2 % to [<sup>14</sup>C]-OCDO formed by 11 $\beta$ -HSD2 in MCF-7 cells (Fig. 4B). Surprisingly, the treatment of cells with CDSN triggers a strong diminution of the intracellular radioactivity (Fig. 4A) whereas the percentage of intracellular [<sup>14</sup>C]-OCDO was not affected by CDSN (Fig. 4B). Indeed, CDSN reduces the intracellular level of both [<sup>14</sup>C]-CT and [<sup>14</sup>C]-OCDO by 69 % and 44 % respectively in MCF-7 cells (Fig. 4C). These results showed that CDSN does not inhibit the biosynthesis of oncosterone on a whole cell assay but inhibits CT uptake in MCF-7 cells.

#### 3.4. Impact of CDSN on oxysterols and cholesterol uptake in breast cancer cells

To get more insight on the ability of CDSN to inhibit the cellular uptake of OS, we evaluate the impact of CDSN compared with ezetimibe (Ez) (i.e., a well-known inhibitor of NPC1L1) that was shown to inhibit the uptake of B-ring OS [63]. MCF-7 cells were treated with [<sup>14</sup>C]-cholesterol, [<sup>14</sup>C]- 5,6 $\alpha$ -EC, [<sup>14</sup>C]- 5,6 $\beta$ -EC and [<sup>14</sup>C]-CT alone or in the presence of 20  $\mu$ M CDSN or with 40  $\mu$ M Ez for 5 h. Cells were then lysed by SDS 0.1 % and the intracellular radioactivity was measured. We found that Ez slightly reduces the uptake of cholesterol by approximately 20 % but did not inhibit the uptake of 5,6 $\alpha$ -E, 5,6 $\beta$ -EC and CT. By contrast, we found that CDSN induced of 70 % reduction of cholesterol uptake and a 17 %, 24 % and 36 % inhibition of 5,6 $\alpha$ -E, 5, 6 $\beta$ -EC and CT uptake respectively (Fig. 5A-D). We next found that in the absence of FBS, which provides lipids including cholesterol to cells,



**Fig. 2.** Chemical synthesis of CDSN. i: HCOOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 50 °C, 1 h. ii: 3 equiv NaOH, EtOH, reflux, 2 h, 86%. iii: a: HCOOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C- rt, 24 h. b: MeOH, 60 °C, 1 h, 92%. iv: a: HCOOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, THF, 0 °C-rt 1 h, 50–60 °C, 3 h, rt, 24 h. b: MeOH, 60 °C, 1 h, 95%.



**Fig. 4. Measurement of the impact of CDSN on <sup>14</sup>C-CT uptake and metabolism in MCF-7 cells.** MCF-7 cells were incubated with 1 μM of [<sup>14</sup>C]-CT for 5 h with or without 20 μM of CDSN. 11β-HSD2 activity (OCDO synthase) was assayed by measuring the conversion of [<sup>14</sup>C]-CT to [<sup>14</sup>C]-OCDO by TLC and quantified as described in Materials and Methods. (A) Quantification of intracellular radioactivity from lipidic extracts of MCF-7 treated with solvent vehicle and CDSN (20 μM); (B) Percentage of intracellular conversion of [<sup>14</sup>C]-CT into [<sup>14</sup>C]-OCDO on MCF-7 treated with solvent vehicle and CDSN (20 μM); (C) Quantification of the intracellular level of [<sup>14</sup>C]-CT and [<sup>14</sup>C]-oncosterone on MCF-7 treated with solvent vehicle or 20 μM CDSN. Values are the mean ± S.E. of three independent experiments each carried out in duplicate. Statistical analysis was carried out using a Student's t-test for unpaired variables. \*, \*\* and \*\*\* in the figures refer to statistical probabilities (P) of < 0.05, < 0.01 and < 0.001, respectively, compared with control cells that received solvent vehicle alone.

CDSN totally blocked sterols uptake suggesting that added sterols are uptaken by cells when associated to FBS components such as lipoproteins. In conclusion, we show that CDSN is an inhibitor of CT, 5,6α-E, 5, 6β-EC and cholesterol uptake in MCF-7 cells, while Ez is slightly active to block only cholesterol uptake. These data suggest that the control by CDSN of the uptake of these sterols is independent of NPC1L1 and may be required for the LDLR endocytic pathway.

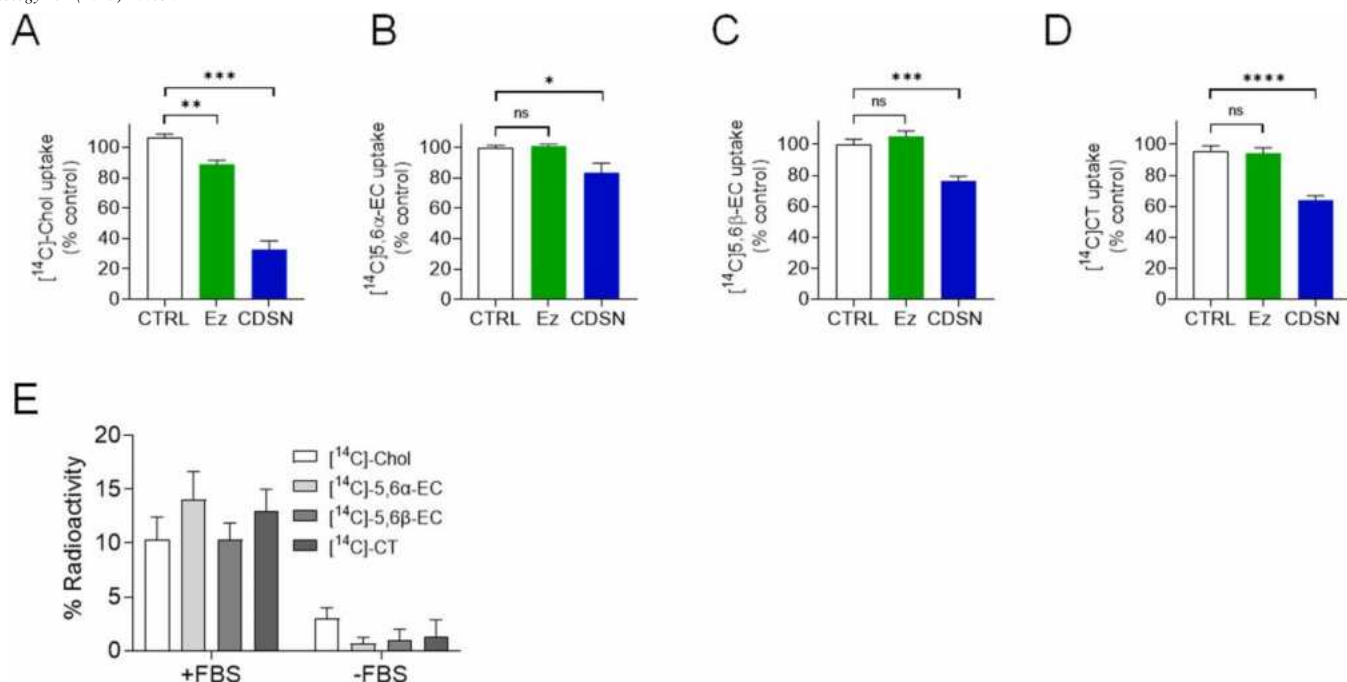
### 3.5. Effect CDSN alone or in combination with post-lanosterol cholesterol biosynthesis inhibitors on MCF-7 cells proliferation and viability

We report here that CDSN inhibits MCF-7 proliferation but was not cytotoxic up to 20 μM (Fig. 6A-C). We previously reported that tamoxifen (Tam) and PBPE triggered the inhibition of cholesterol biosynthesis and a massive accumulation of free sterols [39,64–68]. This was characterized at the cellular level by an increased of the vesicular filipin staining associated to the presence of multilamellar bodies (MLB) in the cytoplasm of MCF-7 cells [39,64–68]. Since the endocytic LDLR pathway is involved NPC1 transporters [69], we were interested to determine if CDSN could enhance sterol storage in MCF-7 cells. Cells were exposed to Tam, PBPE with or without CDSN for 72 h and then cell proliferation and viability was measured. We observed that single treatment with Tam or PBPE inhibit cell proliferation but not viability at these concentrations. We observed that the combination of CDSN with Tam or PBPE induce anoikis that was not observed with single treatment (Fig. 6A)

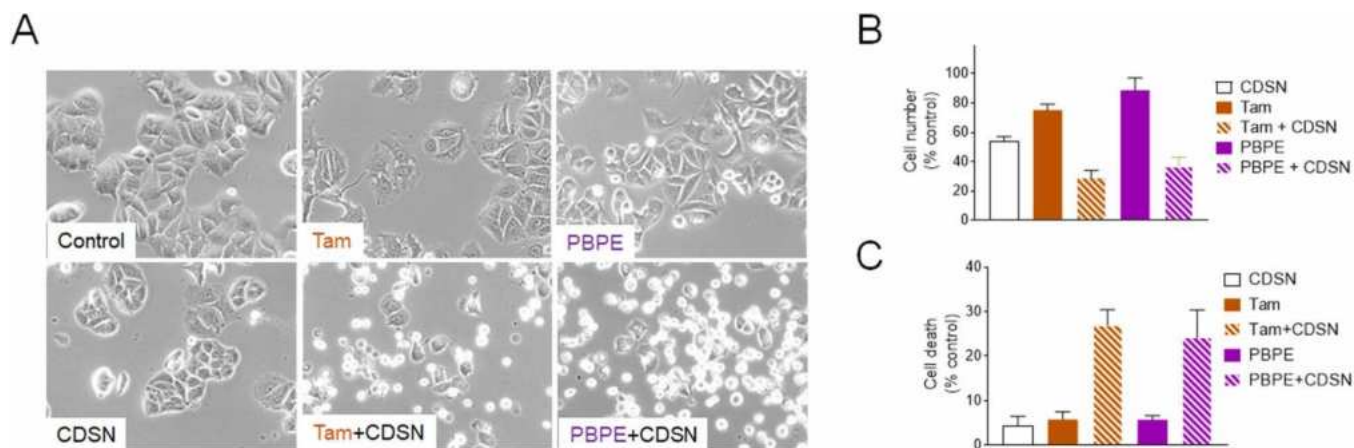
and affect drastically cell viability (Fig. 6C). These data show that CDSN inhibits MCF-7 cell proliferation and this effect was potentiated by the inhibitors of cholesterol biosynthesis Tam and PBPE which led to anoikis and massive cell death.

### 3.6. The combination of CDSN with Tam and PBPE induces frees sterol accumulation and the appearance of giant multilamellar bodies

We next investigated the impact of CDSN treatment of MCF-7 cells on intracellular sterol accumulation, filipin labeling and MLB formation. CDSN alone does not trigger an increased filipin labeling or the appearance of MLB. Tam or PBPE alone trigger an increase of filipin labeling (Fig. 7A) confirming previously published observations [64, 65]. As expected, combination treatments of MCF-7 cells led to an increased filipin labeling (Fig. 7B) and the accumulation of MLB (Fig. 8). These data show that CDSN impact on the dynamic of sterol homeostasis in MCF-7 possibly involving NPC1.



**Fig. 5.** MCF-7 cells were incubated with 1  $\mu\text{M}$  of  $[^{14}\text{C}]\text{-cholesterol}$ , 1  $\mu\text{M}$  of  $[^{14}\text{C}]\text{-}5,6\alpha\text{-EC}$ , 1  $\mu\text{M}$  of  $[^{14}\text{C}]\text{-}5,6\beta\text{-EC}$  or 1  $\mu\text{M}$  of  $[^{14}\text{C}]\text{-CT}$  for 5 h with or without 40  $\mu\text{M}$  of ezetimibe, or 20  $\mu\text{M}$  of CDSN. Cells were lysed with 0.1% SDS and intracellular radioactivity counted with a  $\beta$ -counter. Quantification of intracellular radioactivity from MCF-7 cells exposed to  $[^{14}\text{C}]\text{-Cholesterol}$  (A),  $[^{14}\text{C}]\text{-}5,6\alpha\text{-EC}$  (B),  $[^{14}\text{C}]\text{-}5,6\beta\text{-EC}$  (C) and  $[^{14}\text{C}]\text{-CT}$  (D). The intracellular radioactivity was expressed as the percentage of the intracellular radioactivity measured in the absence of tested compounds (control with solvent vehicle). Values are the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments each carried out in duplicate. Statistical analyses were carried out using a Student's t-test for unpaired variables. \*, \*\* and \*\*\* in the figures refer to statistical probabilities (P) of < 0.05, < 0.01 and < 0.001, respectively, compared with control cells that received solvent vehicle alone.

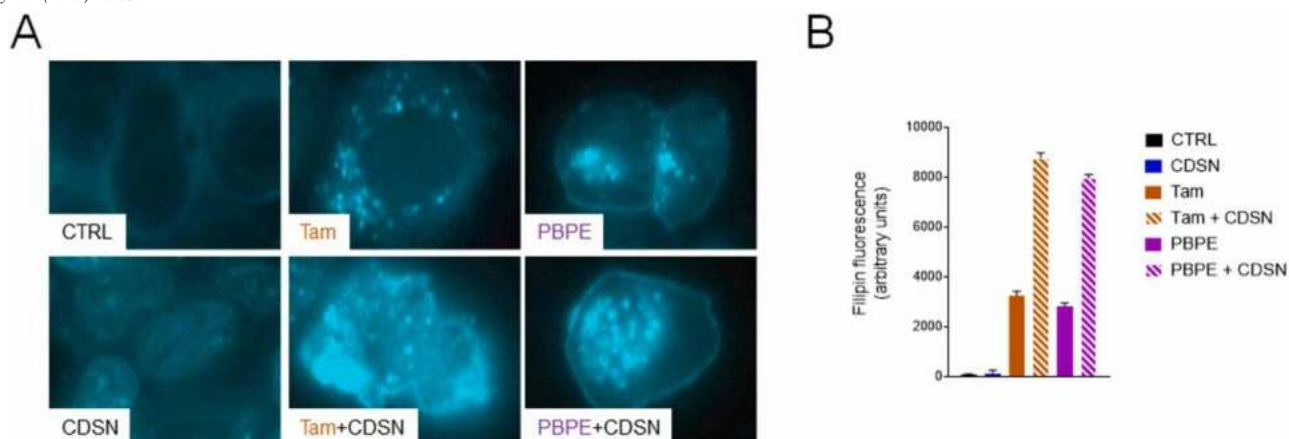


**Fig. 6.** Effect CDSN on MCF-7 cells proliferation and viability. MCF-7 cells were exposed for 3 days to solvent vehicle (Control), 10  $\mu\text{M}$  CDSN alone or a combination with 2.5  $\mu\text{M}$  Tam, or 10  $\mu\text{M}$  PBPE. A) Morphological changes observed by light microscopy (x40); B) Antiproliferative activity. Cells were harvested by trypsinization and counted on a Malassez chamber. Data were expressed as the percentage of cell number relative to control cells; C) Cell death measurement. Cell death was determined by Trypan blue exclusion test. Data were expressed as the percentage of cell death relative to control cells. Values are the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments each carried out in duplicate. Statistical analysis was carried out using a Student's t-test for unpaired variables. \*, \*\* and \*\*\* in the figures refer to statistical probabilities (P) of < 0.05, < 0.01 and < 0.001, respectively, compared with control cells that received solvent vehicle alone.

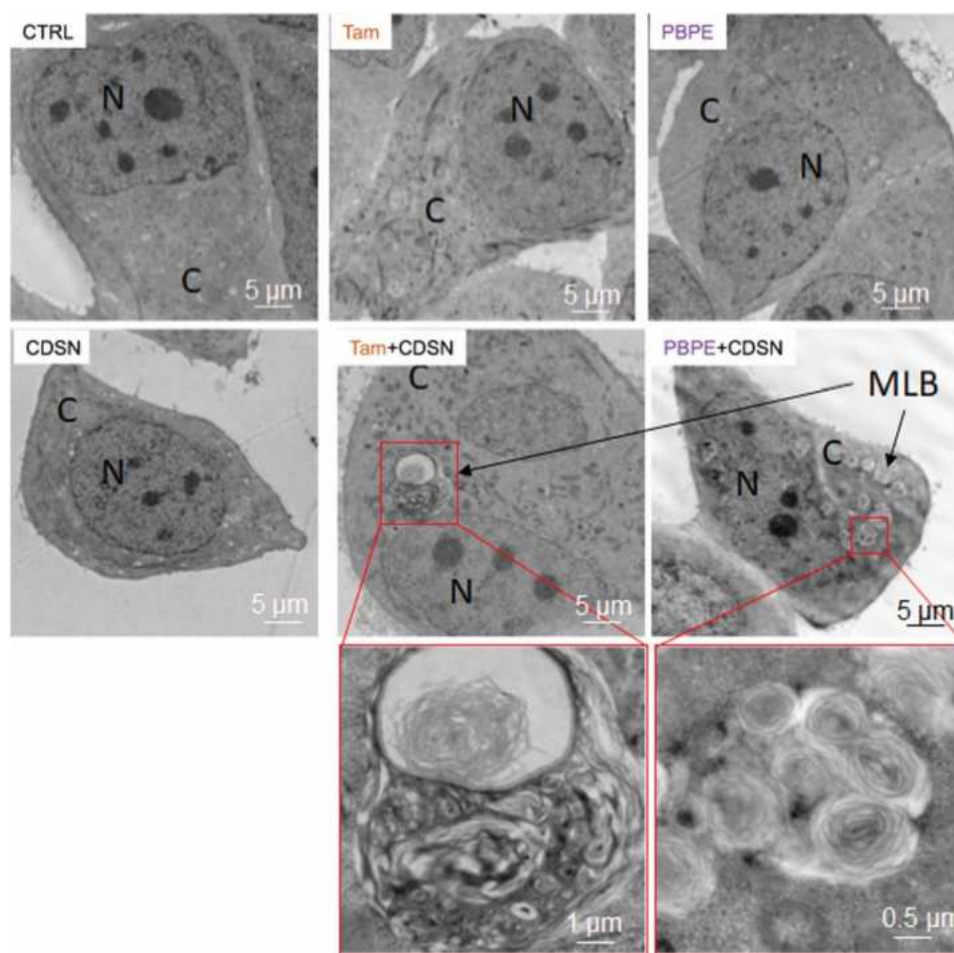
#### 4. Conclusion

We report herein the chemical synthesis of CDSN as a non- hydrolysable analogue of CTS. The synthesis is original and gives the product of interest in 1 step from thiocholesterol oxidation with peroxyformic acid with a yield of 92 % and 95 % when using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  or THF respectively as solvents for the reaction. We next evaluate the biological properties of CDSN, which is a non-hydrolysable analogue of CTS. We first look at the impact of CDSN on the transformation of CT into oncosterone and found that it is a potent inhibitor of the enzyme in cell lysates, suggesting it could be a substrate or an

endogenous inhibitor of the oncosterone synthase (11 $\beta$ -HSD2) (Fig. 9A-B). While we observed that the oncosterone (OCDO) level decreased drastically under CDSN treatment, a careful analysis of this effect ruled out an inhibition of the oncosterone synthase in that case because we found that CDSN inhibited drastically the uptake of CT by MCF-7 cells. In addition, we found that CDSN inhibited not only the uptake of CT but also the uptake of cholesterol, 5,6 $\alpha$ -EC and 5,6 $\beta$ -EC. These data suggest that exogenous CTS could control 5,6-EC and CT homeostasis. The uptake of these sterols can be mediated through several mechanisms using the endocytic



**Fig. 7.** Representative pictures of cells stained with filipin and analyzed by fluorescent microscopy, magnification x 40. MCF-7 cells were exposed for 2 days to solvent vehicle (CTRL); Tam (2.5  $\mu$ M) PBPE (10  $\mu$ M), CDSN (10  $\mu$ M) or a combination of Tam (2.5  $\mu$ M) or PBPE (10  $\mu$ M) with CDSN (10  $\mu$ M).

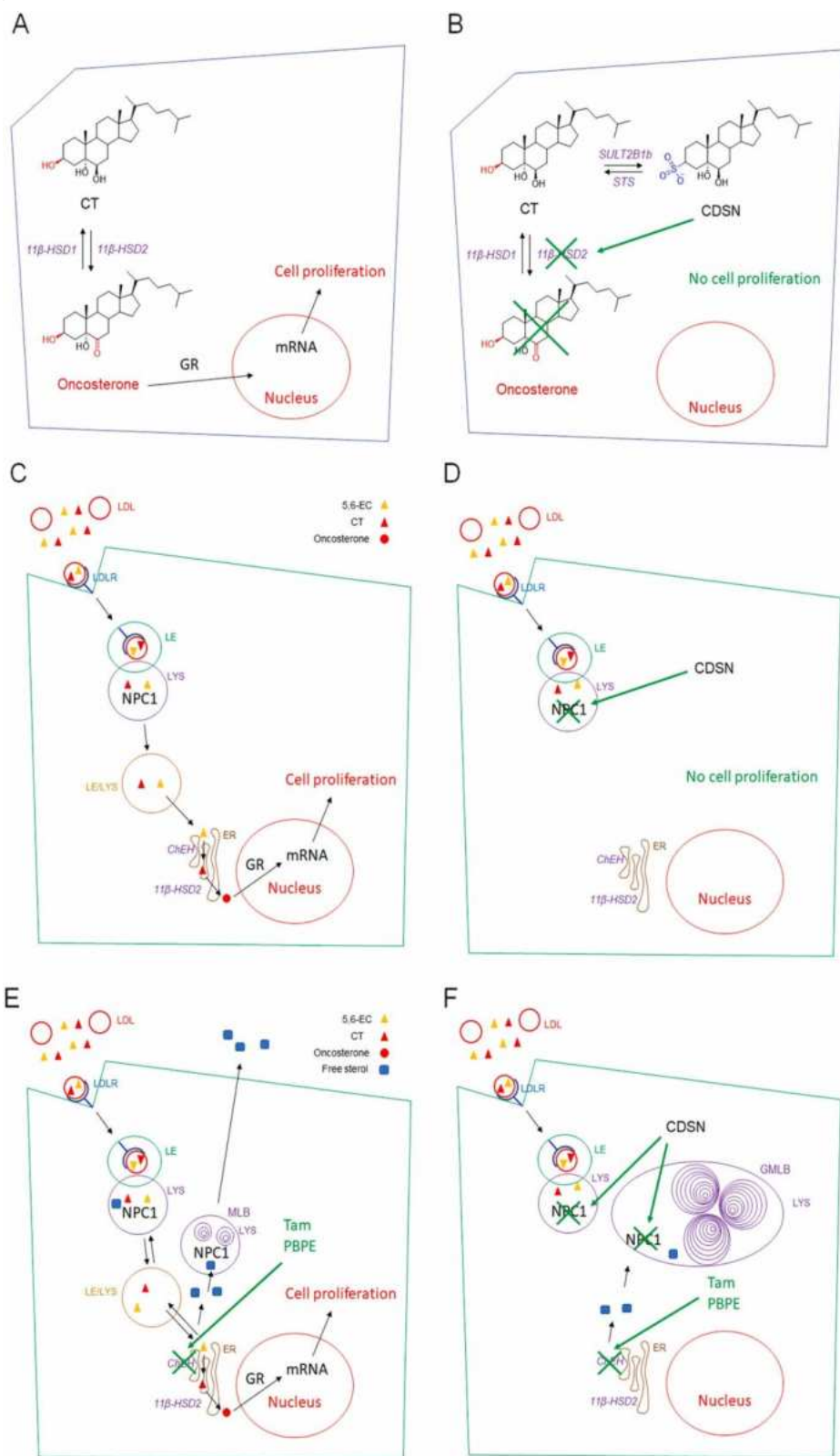


**Fig. 8.** Transmission electron microscopic ultrastructural analysis of MCF7 cells exposed for 2 days to solvent vehicle (CTRL); Tam (2.5  $\mu$ M) PBPE (10  $\mu$ M), CDSN (10  $\mu$ M) or a combination of Tam (2.5  $\mu$ M) and PBPE (10  $\mu$ M) with CDSN (10  $\mu$ M). N, nucleus; C, cytoplasm; LD, lipid droplet; MLB, multilamellar bodies. Experiments were repeated at least three times in duplicate with comparable results. The images presented are representative of three independent experiments.

pathway via the LDLR [70], or transporters such as NPC1L1 which is expressed in MCF-7 cells [71]. We found that CDSN reduces the uptake of cholesterol, which can be partly inhibited by Ezetimide, suggesting that NPC1L1 controls the uptake of 20% of cholesterol in MCF-7 cells. Ezetimide was inefficient to block the uptake of CT and 5,6-ECs suggesting that another mechanism was required. On the other hand, we found that FBS was required for the uptake of sterols suggesting that the tested

sterols were uptaken by cells via lipoproteins such as low density lipoproteins (LDL). LDL are uptaken by cells via LDL receptor, which is controlled by NPC1 [69]. NPC1 is a transporter involved in the transport of cholesterol from the reticulum endoplasmic to lysosomes. It is also involved in the clathrin-coated pits endocytic pathway controlling lipoproteins and virus uptake, which led to the development of NPC1 inhibitors. NPC1 has been identified as pharmacological targets that can





**Fig. 9.** (A) Biosynthesis of oncosterone from CT and stimulation of cell proliferation through the activation of GR by oncosterone. (B) CDSN inhibits the biosynthesis of oncosterone at the 11 $\beta$ -HSD2 level and cell proliferation. (C) LDL transport 5,6-EC and CT into cells that can be further metabolized into oncosterone, which stimulates cell proliferation via the activation of GR. (D) CDSN inhibits 5,6-EC and CT uptake by blocking NPC1, and thus inhibiting oncosterone production and cell proliferation. (E) Tamoxifen and PBE inhibit the ChEH/EBP complex which blocks oncosterone biosynthesis and induce free sterols accumulation due to EBP inhibition. Free sterols accumulation led to the appearance of MLB. (F) Co-treatment of Tam or PBPE with CDSN led to the overaccumulation of free sterols into giant MLB. GR: glucocorticoid receptor; LDL: low density lipoproteins; LDLR: LDL receptor; LE: late endosomes; LYS: lysosomes; ER: endoplasmic reticulum; MLB: multilamellar bodies; GMLB: giant MLB.

block the host cell entrance and the infectivity of several viruses such as ebola virus [72–74], bluetongue virus [75], reovirus [76], african swine fever virus [77], flavivirus [78], HIV [79] and SARS-Cov-2 [80,81]. Interestingly, CT was also used as a chemotype for the development of inhibitors of NPC1 transporters [82,83]. These data support that CDSN inhibits NPC1 and the uptake of 5,6-EC and CT complexed with LDL as summarized on Fig. 9C-D.

CDSN inhibits cell proliferation but was found weakly cytotoxic. The fact that NPC1 may control the uptake of sterols of interest led us test compounds that are inhibitors of cholesterol biosynthesis and that induced the accumulation of free sterols, to determine if CDSN amplified or not sterol accumulation. Tam and PBE have been shown to induce the accumulation of sterols due to their inhibition of cholesterologenic enzymes [64–68,84]. This accumulation was associated to the induction of autophagy in MCF-7 cells and to the appearance of MLB in the cytoplasm of cells [47]. Tam or PBPE combination treatment with CDSN of MCF-7 cells induce the appearance of giant MLB that may results from the inhibition of sterol trafficking in these cells (Fig. 9E-F). The accumulation of sterols and the presence of MLB recapitulates ultrastructural modifications reported in Type C Niemann-Pick disease fibroblasts [85,86].

Altogether, our data strongly suggest that CDSN and therefore CDS could display antitumor activity on breast cancer through the inhibition of oncosterone production. This latter could arise through two mechanisms: 1°) the inhibition of oncosterone biosynthesis by intracellular CDS (Figs. 9A-B) and 2°) the inhibition of cellular uptake of oncosterone precursors (5,6-EC and CT) by extracellular CDS (Fig. 9C-D). This strongly suggests that CDS is a natural CT metabolite that can regulate oncosterone biosynthesis and LDLR-mediated oxysterol cellular uptake.

The impact of CDSN in combination with Tam, PBPE in vivo on tumor implanted in mice would be necessary to validate the potential therapeutic interest of CDSN for BC treatment and suggests that the endogenous production of CTS by BC cells could represent a predictive factor of sensitivity to hormone therapy with tamoxifen and eventually other SERMs. The impact of combination treatments on other BC cells with various phenotypes in term of cholesterol/oxysterols homeostasis, biosynthesis, metabolism, and sterol receptor is worthy of investigation. In particular, BC cell lines that are representative of the different BC subtypes in vitro and in vivo deserves further investigations. These studies would help to determine if CDSN could be a specific or general tool with a therapeutic potential and would paved the way for exploring the importance of the CDS pathway in the physio-pathology and in anticancer strategies.

The potential role of CDS on different pathologies such as Niemann- Pick Type C disease, viral infection and cancer deserves further investigation.

## CRedit authorship contribution statement

**Philippe de Medina**: original draft; experimental, radiolabelled chemistry, biochemistry, cell biology, writing, review. **Silia Ayadi**: experimental, radiolabelled chemistry, biochemistry, cell biology, writing, review. **Regis Soules**: radiolabelled chemistry, writing. **Bruno Payre**: TEM, writing. **Sandrine Rup-Jacques**: Chemistry, structure analysis; writing, review. **Mohammad Samadi**: original draft, chemistry, structure analysis; writing, review. **Sandrine Silvente-Poirot**: original draft; writing, review. **Marc Poirot**: Conceptualization, original draft; writing, review.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

## Data availability

Data will be made available on request.

## Acknowledgments

This work was funded by an internal grant from the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale”, the “Université de Toulouse III”, the “Agence Nationale de la Recherche” (DASYNT2, ANR-20-CE11-0005) and the Institut National du Cancer (PLBIO-2018-145). This study has been partially supported through the grant EUR CARE N°ANR-18-EURE-0003 in the framework of the Program des Investissements d’Avenir.

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.jsbmb.2023.106396](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2023.106396).

## References

- [1] P. de Medina, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, Oxysterols are potential physiological regulators of ageing, *Ageing Res. Rev.* 77 (2022), 101615.
- [2] M. Poirot, S. Silvente-Poirot, m. Team Cholesterol, i. therapeutic, Oxysterols: An expanding family of structurally diversified bioactive steroids, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 194 (2019), 105443.
- [3] P. de Medina, K. Diallo, E. Huc-Claustre, M. Attia, R. Soules, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, The 5,6-epoxycholesterol metabolic pathway in breast cancer: emergence of new pharmacological targets, *Br. J. Pharmacol.* 178 (16) (2021) 3248–3260.
- [4] S. Silvente-Poirot, F. Dalenc, M. Poirot, The effects of cholesterol-derived oncometabolites on nuclear receptor function in cancer, *Cancer Res.* 78 (17) (2018) 4803–4808.
- [5] D.J. Kojetin, T.P. Burris, REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets, *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (3) (2014) 197–216.
- [6] B.A. Janowski, M.J. Grogan, S.A. Jones, G.B. Wisely, S.A. Kliewer, E.J. Corey, D. J. Mangelsdorf, Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1) (1999) 266–271.
- [7] V. Daggubati, D.R. Raleigh, N. Sever, Sterol regulation of developmental and oncogenic Hedgehog signaling, *Biochem. Pharmacol.* 196 (2022), 114647.
- [8] N. Sever, R.K. Mann, L. Xu, W.J. Snell, C.I. Hernandez-Lara, N.A. Porter, P. A. Beachy, Endogenous B-ring oxysterols inhibit the Hedgehog component smoothened in a manner distinct from cyclopamine or side-chain oxysterols, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113 (21) (2016) 5904–5909.
- [9] L. Raccosta, R. Fontana, D. Maggioni, C. Lanterna, E.J. Villablanca, A. Paniccia, A. Musumeci, E. Chiriccozzi, M.L. Trincavelli, S. Daniele, C. Martini, J. A. Gustafsson, C. Doglioni, S.G. Feo, A. Leiva, M.G. Ciampa, L. Mauri, C. Sensi, A. Prinetti, I. Eberini, J.R. Mora, C. Bordignon, K.R. Steffensen, S. Sonnino, S. Sozzani, C. Traversari, V. Russo, The oxysterol-CXCR2 axis plays a key role in the recruitment of tumor-promoting neutrophils, *J. Exp. Med.* 210 (9) (2013) 1711–1728.
- [10] S. Nachtergaele, L.K. Mydock, K. Krishnan, J. Rammohan, P.H. Schlesinger, D. F. Covey, R. Rohatgi, Oxysterols are allosteric activators of the oncoprotein Smoothened, *Nat. Chem. Biol.* 8 (2) (2012) 211–220.
- [11] S. Hannedouche, J. Zhang, T. Yi, W. Shen, D. Nguyen, J.P. Pereira, D. Guerini, B. U. Baumgarten, S. Roggo, B. Wen, R. Knochenmuss, S. Noel, F. Gessier, L.M. Kelly, M. Vanek, S. Laurent, I. Preuss, C. Miault, I. Christen, R. Karuna, W. Li, D.I. Koo, T. Supply, C. Schmedt, E.C. Peters, R. Falchetto, A. Katopodis, C. Spanka, M.O. Roy, M. Detheux, Y.A. Chen, P.G. Schultz, C.Y. Cho, K. Seuwen, J.G. Cyster, A.W. Sailer, Oxysterols direct immune cell migration via EBI2, *Nature* 475 (7357) (2011) 524–527.
- [12] M.A. Rogers, J. Liu, B.L. Song, B.L. Li, C.C. Chang, T.Y. Chang, Acyl-CoA: cholesterol acyltransferases (ACATs/SOATs): enzymes with multiple sterols as substrates and as activators, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 151 (2015) 102–107.
- [13] S. Silvente-Poirot, M. Poirot, Cholesterol epoxide hydrolase and cancer, *Curr. Opin. Pharmacol.* 12 (6) (2012) 696–703.
- [14] P. de Medina, M.R. Paillasse, G. Segala, M. Poirot, S. Silvente-Poirot, Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBs ligands, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (30) (2010) 13520–13525.
- [15] G.J. Schroepfer Jr., Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes, *Physiol. Rev.* 80 (1) (2000) 361–554.
- [16] R.E. Infante, L. Abi-Mosleh, A. Radhakrishnan, J.D. Dale, M.S. Brown, J. L. Goldstein, Purified NPC1 protein. I. Binding of cholesterol and oxysterols to a 1278-amino acid membrane protein, *J. Biol. Chem.* 283 (2) (2008) 1052–1063.
- [17] R.E. Infante, A. Radhakrishnan, L. Abi-Mosleh, L.N. Kinch, M.L. Wang, N. V. Grishin, J.L. Goldstein, M.S. Brown, Purified NPC1 protein: II. Localization of sterol binding to a 240-amino acid soluble luminal loop, *J. Biol. Chem.* 283 (2) (2008) 1064–1075.
- [18] V.M. Olkkonen, The emerging roles of OSBP-related proteins in cancer: impacts through phosphoinositide metabolism and protein-protein interactions, *Biochem. Pharmacol.* 196 (2022), 114455.
- [19] A. Radhakrishnan, Y. Ikeda, H.J. Kwon, M.S. Brown, J.L. Goldstein, Sterol- regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (16) (2007) 6511–6518.
- [20] L. Reinmuth, C.-C. Hsiao, J. Hamann, M. Rosenkilde, J. Mackrill, Multiple targets for oxysterols in their regulation of the immune system, *Cells* (2021).
- [21] J.H. Zhang, L. Ge, W. Qi, L. Zhang, H.H. Miao, B.L. Li, M. Yang, B.L. Song, The N- terminal domain of NPC1L1 protein binds cholesterol and plays essential roles in cholesterol uptake, *J. Biol. Chem.* 286 (28) (2011) 25088–25097.
- [22] M. Poirot, R. Soules, A. Mallinger, F. Dalenc, S. Silvente-Poirot, Chemistry, biochemistry, metabolic fate and mechanism of action of 6-oxo-cholestan-3beta,5alpha-diol (OCDO), a tumor promoter and cholesterol metabolite, *Biochimie* 153 (2018) 139–149.
- [23] M. Poirot, S. Silvente-Poirot, Cholesterol-5,6-epoxides: chemistry, biochemistry, metabolic fate and cancer, *Biochimie* 95 (3) (2013) 622–631.
- [24] B.N. Zanjani, A. Samadi, S.Y. Isikhan, I. Lay, S. Beyaz, A. Gelincik, S. Buyukozturk, N. Arda, Plasma levels of oxysterols 7-ketocholesterol and cholestane-3beta, 5alpha, 6beta-triol in patients with allergic asthma, *J. Asthma* 60 (2) (2023) 288–297.
- [25] A.N. Dang, Do, I.J. Chang, X. Jiang, L.A. Wolfe, B.G. Ng, C. Lam, R.E. Schnur, K. Allis, H. Hansikova, N. Ondruskova, S.D. O'Connor, A. Sanchez-Valle, A. Vollo, R.Y. Wang, Z. Wolfenson, J. Perreault, D.S. Ory, H.H. Freeze, J.L. Merritt, F. D. Porter, Elevated oxysterol and N-palmitoyl-O-phosphocholineserine levels in congenital disorders of glycosylation, *J. Inherit. Metab. Dis.* 46 (2) (2023) 326–334.
- [26] F.D. Porter, D.E. Scherrer, M.H. Lanier, S.J. Langmade, V. Molugu, S.E. Gale, D. Olzeski, R. Sidhu, D.J. Dietzen, R. Fu, C.A. Wassif, N.M. Yanjanin, S.P. Marso, J. House, C. Vite, J.E. Schaffer, D.S. Ory, Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease, *Sci. Transl. Med.* 2 (56) (2010), 56ra81.
- [27] M. Messedi, W. Guidara, S. Grayaa, W. Khrouf, M. Snoussi, Z. Bahloul, D. Bonnefont-Rousselot, F. Lamari, F. Ayadi, Selected plasma oxysterols as a potential multi-marker biosignature panel for Behcet's Disease, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 221 (2022), 106122.
- [28] W. Guidara, M. Messedi, M. Naifar, M. Maalej, W. Khrouf, S. Grayaa, M. Maalej, D. Bonnefont-Rousselot, F. Lamari, F. Ayadi, Plasma oxysterols in drug-free patients with schizophrenia, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 221 (2022), 106123.
- [29] W. Guidara, M. Messedi, M. Maalej, M. Naifar, W. Khrouf, S. Grayaa, M. Maalej, D. Bonnefont-Rousselot, F. Lamari, F. Ayadi, Plasma oxysterols: Altered level of plasma 24-hydroxycholesterol in patients with bipolar disorder, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 211 (2021), 105902.
- [30] A. Kloudova-Spalenkova, Y.F. Ueng, S. Wei, K. Kopeckova, F. Peter Guengerich, P. Soucek, Plasma oxysterol levels in luminal subtype breast cancer patients are associated with clinical data, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 197 (2020), 105566. [31] S. Boenzi, F. Deodato, R. Taurisano, B.M. Goffredo, C. Rizzo, C. Dionisi-Vici, Evaluation of plasma cholestane-3beta,5alpha,6beta-triol and 7-ketocholesterol in inherited disorders related to cholesterol metabolism, *J. Lipid Res.* 57 (3) (2016) 361–367.
- [32] Y.W. Cheng, J.J. Kang, Y.L. Shih, Y.L. Lo, C.F. Wang, Cholesterol-3-beta, 5-alpha, 6-beta-triol induced genotoxicity through reactive oxygen species formation, *Food Chem. Toxicol.* 43 (4) (2005) 617–622.
- [33] H. Liu, L. Yuan, S. Xu, T. Zhang, K. Wang, Cholestane-3beta, 5alpha, 6beta-triol promotes vascular smooth muscle cells calcification, *Life Sci.* 76 (5) (2004) 533–543.



- [34] L. Tang, Y. Wang, T. Leng, H. Sun, Y. Zhou, W. Zhu, P. Qiu, J. Zhang, B. Lu, M. Yan, W. Chen, X. Su, W. Yin, Y. Huang, H. Hu, G. Yan, Cholesterol metabolite cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol suppresses epileptic seizures by negative modulation of voltage-gated sodium channels, *Steroids* 98 (2015) 166–172.
- [35] H. Hu, Y. Zhou, T. Leng, A. Liu, Y. Wang, X. You, J. Chen, L. Tang, W. Chen, P. Qiu, W. Yin, Y. Huang, J. Zhang, L. Wang, H. Sang, G. Yan, The major cholesterol metabolite cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol functions as an endogenous neuroprotectant, *J. Neurosci.* 34 (34) (2014) 11426–11438.
- [36] M.R. Paillasse, N. Saffon, H. Gornitzka, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, P. de Medina, Surprising unreactivity of cholesterol-5,6-epoxides towards nucleophiles, *J. Lipid Res.* 53 (4) (2012) 718–725.
- [37] M. Voisin, P. de Medina, A. Mallingier, F. Dalenc, E. Huc-Claustre, J. Leignadier, N. Serhan, R. Soules, G. Segala, A. Mougél, E. Noguer, L. Mhamdi, E. Bacquie, L. Iuliano, C. Zerbinati, M. Lacroix-Triki, L. Chaltiel, T. Filleron, V. Cavailles, T. Al Saati, P. Rochaix, R. Duprez-Paumier, C. Franchet, L. Ligat, F. Lopez, M. Record, M. Poirot, S. Silvente-Poirot, Identification of a tumor-promoter cholesterol metabolite in human breast cancers acting through the glucocorticoid receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114 (44) (2017) E9346–E9355.
- [38] X.W. Ji, T.Y. Zhou, Y. Lu, M.J. Wei, W. Lu, W.C. Cho, Breast cancer treatment and sulfotransferase, *Expert Opin. Ther. Targets* 19 (6) (2015) 821–834.
- [39] G. Segala, P. de Medina, L. Iuliano, C. Zerbinati, M.R. Paillasse, E. Noguer, F. Dalenc, B. Payre, V.C. Jordan, M. Record, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, 5,6-Epoxy-cholesterols contribute to the anticancer pharmacology of tamoxifen in breast cancer cells, *Biochem. Pharmacol.* 86 (1) (2013) 175–189.
- [40] H. Fuda, N.B. Javitt, K. Mitamura, S. Ikegawa, C.A. Strott, Oxysterols are substrates for cholesterol sulfotransferase, *J. Lipid Res.* 48 (6) (2007) 1343–1352.
- [41] S.J. Bensinger, M.N. Bradley, S.B. Joseph, N. Zelcer, E.M. Janssen, M.A. Hausner, R. Shih, J.S. Parks, P.A. Edwards, B.D. Jamieson, P. Tontonoz, LX $\alpha$  signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response, *Cell* 134 (1) (2008) 97–111.
- [42] J.W. Mueller, L.C. Gilligan, J. Idkowiak, W. Arlt, P.A. Foster, The regulation of steroid action by sulfation and desulfation, *Endocr. Rev.* 36 (5) (2015) 526–563.
- [43] O. Hanyu, H. Nakae, T. Miida, Y. Higashi, H. Fuda, M. Endo, A. Kohjitani, H. Sone, C.A. Strott, Cholesterol sulfate induces expression of the skin barrier protein filaggrin in normal human epidermal keratinocytes through induction of ROR $\alpha$ , *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 428 (1) (2012) 99–104.
- [44] T. Tatsuguchi, T. Uruno, Y. Sugiura, D. Sakata, Y. Izumi, T. Sakurai, Y. Hattori, E. Oki, N. Kubota, K. Nishimoto, M. Oyama, K. Kunimura, T. Ohki, T. Bamba, H. Tahara, M. Sakamoto, M. Nakamura, M. Suematsu, Y. Fukui, Cancer-derived cholesterol sulfate is a key mediator to prevent tumor infiltration by effector T cells, *Int. Immunol.* 34 (5) (2022) 277–289.
- [45] X. Zhang, Q. Bai, G. Kakiyama, L. Xu, J.K. Kim, W.M. Pandak Jr., S. Ren, Cholesterol metabolite, 5-cholesten-3 $\beta$ ,25-diol-3-sulfate, promotes hepatic proliferation in mice, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 132 (3–5) (2012) 262–270.
- [46] C. Song, R.A. Hiipakka, S. Liao, Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis, *Steroids* 66 (6) (2001) 473–479.
- [47] J. Leignadier, F. Dalenc, M. Poirot, S. Silvente-Poirot, Improving the efficacy of hormone therapy in breast cancer: the role of cholesterol metabolism in SERM-mediated autophagy, cell differentiation and death, *Biochem Pharmacol.* 144 (2017) 18–28.
- [48] Y. Wang, W. Lin, J.E. Brown, L. Chen, W.M. Pandak, P.B. Hylemon, S. Ren, 25-Hydroxycholesterol 3-sulfate is an endogenous ligand of DNA methyltransferases in hepatocytes, *J. Lipid Res.* 62 (2021), 100063.
- [49] Y. Wang, X. Li, S. Ren, Cholesterol metabolites 25-hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol 3-sulfate are potent paired regulators: from discovery to clinical usage, *Metabolites* 11 (1) (2020).
- [50] Y. Wang, L. Chen, W.M. Pandak, D. Heuman, P.B. Hylemon, S. Ren, High glucose induces lipid accumulation via 25-hydroxycholesterol DNA-CpG methylation, *iScience* 23 (5) (2020), 101102.
- [51] E.J. Villablanca, L. Raccosta, D. Zhou, R. Fontana, D. Maggioni, A. Negro, F. Sanvito, M. Ponzoni, B. Valentini, M. Bregni, A. Prinetti, K.R. Steffensen, S. Sonnino, J.A. Gustafsson, C. Doglioni, C. Bordignon, C. Traversari, V. Russo, Tumor-mediated liver X receptor- $\alpha$  activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses, *Nat. Med.* 16 (1) (2010) 98–105.
- [52] L.D. Sanchez, L. Pontini, M. Marinozzi, L.C. Sanchez-Aranguren, A. Reis, I.H. K. Dias, Cholesterol and oxysterol sulfates: pathophysiological roles and analytical challenges, *Br. J. Pharmacol.* 178 (16) (2021) 3327–3341.
- [53] P.K. Li, R. Pillai, B.L. Young, W.H. Bender, D.M. Martino, F.T. Lin, Synthesis and biochemical studies of estrone sulfatase inhibitors, *Steroids* 58 (3) (1993) 106–111.
- [54] M. Poirot, P. de Medina, F. Delarue, J.J. Perie, A. Klæbe, J.C. Faye, Synthesis, binding and structure-affinity studies of new ligands for the microsomal anti-estrogen binding site (AEBS), *Bioorg. Med. Chem.* 8 (8) (2000) 2007–2016.
- [55] L. Yoder, The replacement of secondary hydroxyl groups by sulfonic acid substituents 1, *J. Org. Chem.* 20 (10) (1955) 1317–1321.
- [56] K.R. Beck, L. Telisman, C.J. van Koppen, G.R. Thompson 3rd, A. Odermatt, Molecular mechanisms of posaconazole- and itraconazole-induced pseudohyperaldosteronism and assessment of other systemically used azole antifungals, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 199 (2020), 105605.
- [57] P. de Medina, M.R. Paillasse, G. Segala, M. Voisin, L. Mhamdi, F. Dalenc, M. Lacroix-Triki, T. Filleron, F. Pont, T.A. Saati, C. Morisseau, B.D. Hammock, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, Dendrogenin A arises from cholesterol and histamine metabolism and shows cell differentiation and anti-tumour properties, *Nat. Commun.* 4 (2013) 1840.
- [58] M. Record, M. Attia, K. Carayon, L. Pucheu, J. Bunay, R. Soules, S. Ayadi, B. Payre, L. Perrin-Cocon, F. Bourgaill, A. Lamaziere, V. Lotteau, M. Poirot, S. Silvente-Poirot, P. de Medina, Targeting the liver X receptor with dendrogenin A differentiates tumour cells to secrete immunogenic exosome-enriched vesicles, *J. Extra Vesicles* 11 (4) (2022), e12211.
- [59] L. Rajagopalan, J.N. Greeson, A. Xia, H. Liu, A. Sturm, R.M. Raphael, A. L. Davidson, J.S. Oghalai, F.A. Pereira, W.E. Brownell, Tuning of the outer hair cell motor by membrane cholesterol, *J. Biol. Chem.* 282 (50) (2007) 36659–36670.
- [60] P. de Medina, B.L. Payre, J. Bernad, I. Bosser, B. Pipy, S. Silvente-Poirot, G. Favre, J.C. Faye, M. Poirot, Tamoxifen is a potent inhibitor of cholesterol esterification and prevents the formation of foam cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308 (3) (2004) 1165–1173.
- [61] L.C. King, R.M. Dodson, L.A. Subluskey, Preparation and structure of cholesteryl quaternary salts, *J. Am. Chem. Soc.* 70 (3) (1948) 1176.
- [62] B. Dayal, K. Rao, G. Salen, Microwave-induced organic reactions of bile acids: esterification, deformation and deacetylation using mild reagents, *Steroids* 60 (6) (1995) 453–457.
- [63] F. Stellaard, K. von Bergmann, T. Sudhop, D. Lutjohann, The value of surrogate markers to monitor cholesterol absorption, synthesis and bioconversion to bile acids under lipid lowering therapies, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 169 (2017) 111–122.
- [64] B. Payre, P. de Medina, N. Boubekur, L. Mhamdi, J. Bertrand-Michel, F. Terce, I. Fourquaux, D. Goudouneche, M. Record, M. Poirot, S. Silvente-Poirot, Microsomal antiestrogen-binding site ligands induce growth control and differentiation of human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism, *Mol. Cancer Ther.* 7 (12) (2008) 3707–3718.
- [65] P. de Medina, B. Payre, N. Boubekur, J. Bertrand-Michel, F. Terce, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, Ligands of the antiestrogen-binding site induce active cell death and autophagy in human breast cancer cells through the modulation of cholesterol metabolism, *Cell Death Differ.* 16 (10) (2009) 1372–1384.
- [66] P. de Medina, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, Tamoxifen and AEBS ligands induced apoptosis and autophagy in breast cancer cells through the stimulation of sterol accumulation, *Autophagy* 5 (7) (2009) 1066–1067.
- [67] B. Sola, M. Poirot, P. de Medina, S. Bustany, V. Marsaud, S. Silvente-Poirot, J. M. Renoir, Antiestrogen-binding site ligands induce autophagy in myeloma cells that proceeds through alteration of cholesterol metabolism, *Oncotarget* 4 (6) (2013) 911–922.
- [68] G. Segala, M. David, P. de Medina, M.C. Poirot, N. Serhan, F. Vergez, A. Mougél, E. Saland, K. Carayon, J. Leignadier, N. Caron, M. Voisin, J. Cherier, L. Ligat,

- F. Lopez, E. Noguier, A. Rives, B. Payre, T.A. Saati, A. Lamaziere, G. Despres, J. M. Lobaccaro, S. Baron, C. Demur, F. de Toni, C. Larrue, H. Boutzen, F. Thomas, J. E. Sarry, M. Tosolini, D. Picard, M. Record, C. Recher, M. Poirot, S. Silvente-Poirot, Dendrogenin A drives LXR to trigger lethal autophagy in cancers, *Nat. Commun.* 8 (1) (2017) 1903.
- [69] J. Luo, L. Jiang, H. Yang, B.L. Song, Routes and mechanisms of post-endosomal cholesterol trafficking: a story that never ends, *Traffic* 18 (4) (2017) 209–217.
- [70] J. Ye, X. Xia, W. Dong, H. Hao, L. Meng, Y. Yang, R. Wang, Y. Lyu, Y. Liu, Cellular uptake mechanism and comparative evaluation of antineoplastic effects of paclitaxel-cholesterol lipid emulsion on triple-negative and non-triple-negative breast cancer cell lines, *Int. J. Nanomed.* 11 (2016) 4125–4140.
- [71] W. Liu, B. Liang, J. Zeng, J. Meng, L. Shi, S. Yang, J. Chang, C. Wang, X. Hu, X. Wang, N. Han, C. Lu, J. Li, C. Wang, H. Li, R. Zhang, D. Xing, First discovery of cholesterol-lowering activity of parthenolide as NPC1L1 inhibitor, *Molecules* 27 (19) (2022).
- [72] H. Liu, Y. Tian, K. Lee, P. Krishnan, M.K. Wang, S. Whelan, E. Mevers, V. Soloveva, B. Dedic, X. Liu, J.M. Cunningham, Identification of potent ebola virus entry inhibitors with suitable properties for in vivo studies, *J. Med. Chem.* 61 (14) (2018) 6293–6307.
- [73] M. Cote, J. Misasi, T. Ren, A. Bruchez, K. Lee, C.M. Filone, L. Hensley, Q. Li, D. Ory, K. Chandran, J. Cunningham, Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection, *Nature* 477 (7364) (2011) 344–348.
- [74] J.E. Carette, M. Raaben, A.C. Wong, A.S. Herbert, G. Obernosterer, N. Mulherkar, A.I. Kuehne, P.J. Kranzusch, A.M. Griffin, G. Ruthel, P. Dal Cin, J.M. Dye, S. P. Whelan, K. Chandran, T.R. Brummelkamp, Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1, *Nature* 477 (7364) (2011) 340–343. [75] L. John, C. Vernersson, H. Kwon, U. Elling, J.M. Penninger, A. Mirazimi, Redirecting imipramine against bluetongue virus infection: insights from a genome-wide haploid screening study, *Pathogens* 11 (5) (2022).
- [76] P. Ortega-Gonzalez, G. Taylor, R.K. Jangra, R. Tenorio, I. Fernandez de Castro, B. A. Mainou, R.C. Orchard, C.B. Wilen, P.H. Bringleb, J. Sojati, K. Chandran, M. Sachse, C. Risco, T.S. Dermody, Reovirus infection is regulated by NPC1 and endosomal cholesterol homeostasis, *PLOS Pathog.* 18 (3) (2022), e1010322. [77] M.A. Cuesta-Geijo, I. Garcia-Dorival, A. Del Puerto, J. Urquiza, I. Galindo, L. Barrado-Gil, F. Lasala, A. Cayuela, C.O.S. Sorzano, C. Gil, R. Delgado, C. Alonso, New insights into the role of endosomal proteins for African swine fever virus infection, *PLOS Pathog.* 18 (1) (2022), e1009784.
- [78] A. Krishnan, E.H. Miller, A.S. Herbert, M. Ng, E. Ndungo, S.P. Whelan, J.M. Dye, K. Chandran, Niemann-Pick C1 (NPC1)/NPC1-like1 chimeras define sequences critical for NPC1's function as a flavivirus entry receptor, *Viruses* 4 (11) (2012) 2471–2484.
- [79] E.M. Coleman, T.N. Walker, J.E. Hildreth, Loss of Niemann Pick type C proteins 1 and 2 greatly enhances HIV infectivity and is associated with accumulation of HIV Gag and cholesterol in late endosomes/lysosomes, *Virol. J.* 9 (2012) 31.
- [80] C. Vial, J.F. Calderon, A.D. Klein, NPC1 as a modulator of disease severity and viral entry of SARS-CoV-2, *Curr. Mol. Med.* 21 (1) (2021) 2–4.
- [81] R.A. Ballout, D. Sviridov, M.I. Bukrinsky, A.T. Remaley, The lysosome: a potential juncture between SARS-CoV-2 infectivity and Niemann-Pick disease type C, with therapeutic implications, *FASEB J.* 34 (6) (2020) 7253–7264.
- [82] K. Ohgane, F. Karaki, T. Noguchi-Yachide, K. Dodo, Y. Hashimoto, Structure- activity relationships of oxysterol-derived pharmacological chaperones for Niemann-Pick type C1 protein, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24 (15) (2014) 3480–3485.
- [83] K. Ohgane, F. Karaki, K. Dodo, Y. Hashimoto, Discovery of oxysterol-derived pharmacological chaperones for NPC1: implication for the existence of second sterol-binding site, *Chem. Biol.* 20 (3) (2013) 391–402.
- [84] B. Kedjouar, P. de Medina, M. Oulad-Abdelghani, B. Payre, S. Silvente-Poirot, G. Favre, J.C. Faye, M. Poirot, Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site, *J. Biol. Chem.* 279 (32) (2004) 34048–34061.
- [85] B.R. Roszell, J.Q. Tao, K.J. Yu, L. Gao, S. Huang, Y. Ning, S.I. Feinstein, C.H. Vite, S. R. Bates, Pulmonary abnormalities in animal models due to Niemann-Pick type C1 (NPC1) or C2 (NPC2) disease, *PLOS One* 8 (7) (2013), e67084.
- [86] V. Demais, A. Barthelemy, M. Perraut, N. Ungerer, C. Keime, S. Reibel, F. W. Pfrieger, Reversal of pathologic lipid accumulation in NPC1-deficient neurons by drug-promoted release of LAMP1-coated lamellar inclusions, *J. Neurosci.* 36 (30) (2016) 8012–8025.

## Résultats et discussions

Le cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -sulfate (CDS) a été identifié comme un métabolite présent dans les cellules cancéreuses mammaires (Segala et al. 2013), mais ses effets biologiques demeurent inconnus en raison de sa désulfatation rapide par la Steroïde Sulfatase (STS) (Segala et al. 2013; Mueller et al. 2015). Par conséquent, nous avons réalisé la synthèse de son analogue non-hydrolysable, le cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3-sulfonate (CDSN). Sa synthèse a été réalisée en quatre étapes à partir du cholestérol avec un rendement d'environ 95%. Une fois synthétisé et caractérisé, nous avons procédé à l'évaluation des propriétés biologiques de cette nouvelle molécule sur cellules.

Nous avons d'abord évalué l'effet du CDSN sur la biosynthèse de l'OCDO en suivant la conversion du CT radiomarké [ $^{14}\text{C}$ ]-CT en [ $^{14}\text{C}$ ]-OCDO catalysée par l'enzyme 11 $\beta$ -HSD2 sur lysat HEK293T-11HSD2. Nos résultats montrent que le CDSN inhibe cette conversion de manière dose-dépendante, avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de  $2,55 \pm 0,63 \mu\text{M}$ . Cependant, Le CDSN exerce une inhibition de l'enzyme 11 $\beta$ -HSD2 sans entraîner la formation d'un produit correspondant à une forme oxydée en C6, indiquant ainsi que le CDSN n'est pas un substrat de la 11 $\beta$ -HSD2. Sur les cellules MCF-7 entières, le CDSN ne semble pas inhiber directement la biosynthèse de [ $^{14}\text{C}$ ]-OCDO à partir du [ $^{14}\text{C}$ ]-CT. En revanche, il inhibe l'internalisation du [ $^{14}\text{C}$ ]-CT par les cellules empêchant ainsi sa métabolisation en [ $^{14}\text{C}$ ]-OCDO.

Pour mieux comprendre par quelle voie le CDSN influence l'internalisation des stérols dans les cellules, nous avons comparé ses effets à ceux de l'ezetimibe (Ez), un inhibiteur bien caractérisé du transporteur NPC1L1 (Niemann-Pick disease C1-like 1), essentiel dans le processus d'absorption des stérols (Stellaard et al. 2017). Cette comparaison vise à établir si le CDSN exerce son action par un mécanisme similaire à celui de l'ezetimibe ou s'il implique un mécanisme distinct pour moduler l'internalisation des stérols. Les résultats ont montré que l'Ez réduit légèrement l'absorption du cholestérol (environ 20 %) sans affecter l'absorption des oxystérols. En revanche, le CDSN a diminué l'absorption du cholestérol de 70 % et des oxystérols (5,6 $\alpha$ -EC, 5,6 $\beta$ -EC et CT) respectivement de 17 %, 24 % et 36 %. De plus en l'absence de sérum, le CDSN a complètement bloqué l'absorption des stérols, ceci suggère que son action est indépendante du transporteur NPC1L1 et l'absorption des stérols implique probablement une autre voie, impliquant les lipoprotéines fournies par le sérum tels que les

LDL, qui sont internalisées par endocytose via le récepteur des LDL (LDLR) et dont le fonctionnement requiert un participant clé dans ce trafic intracellulaire, la protéine NPC1, essentielle pour ce trafic intracellulaire du cholestérol (Millard et al. 2005; J. Luo et al. 2017) et dont la surexpression conduit à la prolifération et l'invasivité tumorale de ces cellules (O'Neill et al. 2022).

Le fait que le CDSN bloque l'internalisation du cholestérol et des oxystérols potentiellement *via* une inhibition de NPC1 dépendante de la voie LDL/LDLR, nous a conduits à déterminer si le CDSN joue un rôle dans l'augmentation des niveaux de stérols libres lorsque la biosynthèse du cholestérol est inhibée. L'accumulation de stérols est un effet déjà observé et caractérisé par mon équipe avec le Tamoxifène (Tam) et le PBPE due à l'inhibition de l'enzyme ChEH impliquée dans la cholestérogénèse (Kedjouar et al. 2004; Philippe De Medina, Silvente-Poirot, et Poirot 2009b). Nous avons observé que le CDSN en co-traitement avec le Tam et le PBPE stimule l'accumulation de stérols libres. Cette accumulation est liée à une augmentation des vésicules contenant des stérols libres, marquées par la coloration à la filipine. Cette observation est caractéristique de la maladie de NPC1 également, où la présence de stérols libres marqués par la filipine est le test de référence pour le diagnostic de la maladie (Geberhiwot et al. 2018; Roney et al., 2021). Cette accumulation est accompagnée de la formation de corps multilamellaires géants observés par microscopie électronique à transmission, dont leur formation est également observée dans la maladie de NPC1 (Roney et al. 2021). Nous avons montré que le traitement de cellules MCF-7 avec le CDSN seul inhibe la prolifération des cellules, probablement en bloquant la conversion CT en OCDO sans aucune toxicité observée jusqu'à une concentration de 20  $\mu$ M. En revanche, le CDSN potentialise les effets cytotoxiques du tamoxifène et du PBPE qui pourrait résulter d'une hyperaccumulation intracellulaire de stérols, provoquée par la combinaison du CDSN avec ces agents probablement par l'inhibition de NPC1.

### Conclusion et perspectives

Dans cette étude, nous avons rapporté la synthèse originale et la caractérisation du CDSN, un dérivé non hydrolysable du CDS dans le but d'évaluer si le CDS, métabolite du CT, pouvait être biologiquement actif. Le CDSN se révèle être un puissant inhibiteur de la synthèse d'OCDO dans les lysats cellulaires, bien que son effet principal soit la réduction de l'absorption de CT

et de ses précurseurs dans un contexte cellulaire MCF-7. Ce phénomène suggère que le CDS pourrait interférer avec le transport des stérols via le récepteur LDLR et le transporteur NPC1. Ces résultats indiquent que le CDSN et donc de son analogue, le CDS pourrait être bioactif ayant une activité anti-tumorale contre le cancer du sein en inhibant la production d'OCDO et en perturbant l'absorption des précurseurs de l'OCDO. Par ailleurs, le CDSN inhibe la prolifération cellulaire avec une toxicité faible et lorsqu'il est combiné avec le Tam ou le PBPE, il induit une accumulation de stérols et l'apparition de structures similaires à celles observées dans la maladie de NPC1 avec une plus grande toxicité observée. Indiquant un mécanisme d'action potentiel lié à la perturbation du trafic des stérols. Des études futures sont nécessaires pour explorer son potentiel thérapeutique *in vivo*, en particulier en combinaison avec d'autres traitements et à travers différents sous-types de cancer du sein. Des recherches supplémentaires devraient également examiner le rôle du CDSN dans d'autres maladies, y compris la maladie de NPC1.

## Article 2

### La 27-Hydroxylation de l'oncosterone par le CYP27A1 modifie son activité de promoteur de tumeur en activité anti-tumorale.

Silia Ayadi, Silvia Friedrichs, Regis Soulès, Laly Pucheu, Dieter Lütjohann, Sandrine Silvente-Poirot, Marc Poirot, Philippe de Medina.

(Article publié, DOI: [10.1016/j.jlr.2023.100479](https://doi.org/10.1016/j.jlr.2023.100479))

#### Introduction

Le cholestérol est sujet aux oxydations par des processus enzymatiques et non enzymatiques, conduisant à la formation d'oxystérols. Les oxystérols formés par l'oxydation de la chaîne latérale isooctyle du cholestérol, sont principalement générés par l'action d'enzymes appartenant à la famille des cytochromes P450 (CYP450). La cholestérol 27-hydroxylase (CYP27A1) est un CYP450 responsable de la conversion du cholestérol en 27-Hydroxycholestérol (27-HC) (Cali et Russell 1991). Le 27-HC a été identifié comme un ligand endogène du récepteur des œstrogènes (ER $\alpha$ ) et peut agir comme un agoniste ou un antagoniste selon le tissu, le classant ainsi parmi les SERMs (modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes) (Umetani et al. 2007). Dans le contexte des cancers du sein (CS), le 27-HC joue un rôle de promoteur tumoral en favorisant le développement des tumeurs mammaires exprimant l'ER $\alpha$  (ER $\alpha$ +) (DuSell et al. 2008). Il a été montré que Le 27-HC stimule la croissance tumorale *via* l'ER $\alpha$  (Wu et al. 2013; E. R. Nelson et al. 2013), tandis que son activation des LXRs est liée à des effets pro-métastatiques (E. R. Nelson et al. 2013). Par ailleurs notre équipe a récemment démontré qu'un métabolite du cholestérol nommé oncosterone (6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,6 $\beta$ -diol, OCDO) joue un rôle de promoteur de tumeur non seulement pour les CS (ER $\alpha$ +) mais également pour les CS triple négatif (TN) (Voisin et al. 2017). L'OCDO est un oxystérol caractérisé par une oxydation au niveau du cycle B et est produit en trois étapes à partir du cholestérol : 1) le cholestérol est d'abord oxygéné au niveau de sa double liaison en position C5-C6, générant les diastéréoisomères 5,6-ECs: 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -époxycholestanol (5,6 $\alpha$ -EC) et 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -époxycholestanol (5,6 $\beta$ -EC) (Poirot et Silvente-Poirot 2013c). 2) en situation tumorale, ces 5,6-ECs sont ensuite hydrolysés en cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT) par la cholestérol-5,6-époxyde hydrolase (ChEH) (Philippe De Medina et al. 2010a). 3) le CT est oxydé en 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol (OCDO) par la 11 $\beta$ -hydroxystéroïde-

déshydrogénase 2 (11 $\beta$ -HSD2) (Voisin et al. 2017). À la différence du 27-HC, l'OCDO stimule la prolifération des cellules du CS indépendamment de l'expression du ER $\alpha$ , en agissant principalement *via* le récepteur des glucocorticoïdes  $\alpha$  (GR $\alpha$ ), et exerce son invasivité tumorale, probablement en activant les LXR (Voisin et al. 2017; Poirot et al. 2018). Un taux élevé d'OCDO ainsi que les enzymes impliquées dans sa biosynthèse constituent des facteurs de mauvais pronostic des CS (Voisin et al. 2017; Silvente-Poirot, Dalenc, et Poirot 2018). Par ailleurs le CYP27A1 est une enzyme avec un large spectre de substrat, hydroxylant principalement les stéroïdes en position C27, avec les substrats polaires sont hydroxylés plus efficacement que les moins polaires (Björkhem et Gustafsson 1973). L'oxystérol 7-Céto-cholestérol (7-KC) cytotoxique est également substrat du CYP27A1 menant au 7-Céto-27-Hydroxycholestérol (7KC-27HC) (Brown et al. 2000), une transformation associée à une réduction de la toxicité cellulaire de cet oxystérol (Beck, Inderbinen, et al. 2019; Heo et al. 2011b). Le métabolisme de l'OCDO est encore mal connu, mais la présence d'une fonction cétone dans le cycle B suggère que l'OCDO pourrait être un substrat potentiel pour le CYP27A1, comme le 7-KC. En raison de la diversité des substrats que le CYP27A1 peut catalyser, il est possible que cette enzyme puisse également catalyser l'hydroxylation de ses précurseurs, le CT et les 5,6-ECs.

## Démarche

Dans ce contexte, nous avons entrepris l'étude du métabolisme de l'OCDO et de ses précurseurs CT et 5,6-ECs, en particulier leur possible 27-hydroxylation par le CYP27A1. En l'absence de standards analytiques commerciaux nous avons donc synthétisé une série de standards permettant de les identifier correctement. Nous avons d'abord étudié la 27-hydroxylation de l'OCDO, du CT, et des 5,6-ECs par le CYP27A1. Ensuite, nous avons évalué si les formes 27-hydroxylées des 5,6-ECs (27H-5,6ECs) peuvent servir de substrat à la ChEH, cette enzyme ayant jusqu'à présent seulement les 5,6-ECs comme substrats connus, ou si le 27H-CT peut être substrat de la 11 $\beta$ -HSD2, enzyme qui catalyse l'oxydation d'un large éventail de substrats. La disponibilité de ces standards nous permettra de suivre les transformations/formations des composés par différentes méthodes analytiques. Une question clé est la distinction entre les dérivés 27-hydroxylés et les autres dérivés hydroxylés qui pourraient se former sur la chaîne latérale. Pour cela, nous avons également synthétisé



des dérivés 25-hydroxylés, afin de disposer de standards pertinents pour évaluer la capacité de la méthode analytique à distinguer ces différents dérivés.

Nous avons sélectionné à partir de la base de données [ProteinAtlas](#), des lignées cancéreuses mammaires reportées comme exprimant l'enzyme CYP27A1 au niveau de l'ARNm à différents niveaux :

- ⇒ MCF-7 : Lignée cellulaire humaine de CS (ER $\alpha$ +) n'exprimant pas l'enzyme CYP27A1 (0 nTPM), utilisée comme contrôle négatif
- ⇒ MDA-MB-231 : Lignée cellulaire humaine de CS (TN) exprimant l'enzyme CYP27A1 à un niveau faible (5.1 nTPM)
- ⇒ MDA-MB-468 : Lignée cellulaire humaine de CS (TN) exprimant l'enzyme CYP27A1 à un niveau élevé (39.4 nTPM).
- ⇒ HepG2 : Lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain sur-exprimant l'enzyme CYP27A1 (217.7 nTPM), servant de contrôle positif

Ces trois lignées expriment également les enzymes menant à la formation de l'OCDO, la ChEH ainsi que la 11 $\beta$ -HSD2.

- ⇒ Nous avons également sélectionné des cellules **HEK293T** (Human Embryonic Kidney) 293T : Une lignée cellulaire immortalisée dérivée de cellules de rein embryonnaire humain, ces cellules ont été transfectées avec un plasmide codant pour la 11 $\beta$ -HSD2 qui sera la source de lysat HEK293T-11 $\beta$ -HSD2.

Nous avons ensuite validé l'expression de l'enzyme CYP27A1 par Western Blot sur les différentes lignées cellulaires sélectionnées. Les résultats obtenus pour le niveau d'expression de CYP27A1 étaient conformes aux données disponibles dans les bases de données. Nous avons également évalué l'expression des ARNm des enzymes susceptibles d'introduire un groupe hydroxyle sur la chaîne latérale. Nous avons trouvé que la **CH25H**, responsable de l'hydroxylation en position C25, était faiblement exprimée dans les cellules MDA-MB-231 (1.2 nTPM) et absente dans les autres lignées étudiées. Le **CYP46A1**, impliqué dans l'hydroxylation en position C24, était également faiblement exprimé dans les cellules MCF-7 (0.3 nTPM) et absente les autres lignées étudiées. Enfin, le **CYP11A1** présentait une expression inférieure à 0,5 nTPM dans les trois lignées étudiées et était absent dans les cellules MCF-7.

Nous avons synthétisé et caractérisé les différents standards radiomarqués et non radiomarqués, incluant les 5,6-ECs, le CT, et l'OCDO à partir du cholestérol, ainsi que leurs formes 27- et 25-hydroxylées obtenues à partir du 27-Hydroxycholestérol et du 25-Hydroxycholestérol, respectivement. Nous avons ensuite incubé les lignées cellulaires avec les précurseurs radiomarqués suivants : [ $^{14}\text{C}$ ]-l'OCDO et ses précurseurs : le [ $^{14}\text{C}$ ]-5,6 $\alpha$ -EC, le [ $^{14}\text{C}$ ]-5,6 $\beta$ -EC et le [ $^{14}\text{C}$ ]-CT. Le suivi de leur métabolisation en produits 27/25-hydroxylés a été réalisé par chromatographie sur couche mince (CCM). Cependant, les conditions de séparation par CCM utilisées permettent de distinguer les formes hydroxylées de leurs précurseurs, mais ne permettent pas de différencier les formes 27- et 25-hydroxylées entre elles.

Pour déterminer la position de l'hydroxylation des métabolites formés, nous avons mis en place une méthode de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Cette méthode permet de différencier les formes 27- et 25-hydroxylées grâce aux fragmentations spécifiques et aux temps de rétention distincts des différents standards hydroxylés. Nous avons ensuite évalué l'implication du CYP27A1 dans l'hydroxylation en combinant une approche pharmacologique, utilisant un inhibiteur spécifique de l'enzyme, et une approche génétique, en éteignant l'expression du CYP27A1. Nous avons évalué si le 27H-CT pouvait servir de substrat pour l'enzyme 11 $\beta$ -HSD2, à la fois au niveau enzymatique à partir de lysat cellulaire HEK293T-11 $\beta$ -HSD2 et dans un contexte cellulaire. De manière similaire, nous avons testé si les 27H-5,6-ECs pouvaient être des substrats pour la ChEH au niveau cellulaire. Les effets biologiques du 27H-OCDO ont été testés sur les cellules MCF-7 et MDA-MB-231, seul ou en co-traitement avec le 27-HC et l'OCDO.

## 27-hydroxylation of oncosterone by CYP27A1 switches its activity from pro-tumor to anti-tumor

Silia Ayadi<sup>1,2,3</sup>, Silvia Friedrichs<sup>4</sup>, Regis Soul s<sup>1,2,3</sup>, Laly Pucheu<sup>1,2,3</sup>, Dieter L tjohann<sup>4</sup>, Sandrine Silvente-Poirot<sup>1</sup>, Marc Poirot<sup>1,2,3#</sup> and Philippe de Medina<sup>1,2,3#</sup>

<sup>1</sup> Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Inserm, CNRS, University of Toulouse, Team INOV: "Cholesterol Metabolism and Therapeutic Innovations", Toulouse, France. <sup>2</sup> Equipe labellis e par la Ligue Nationale contre le Cancer. <sup>3</sup> French network for Nutrition physical Activity And Cancer Research (NACRe network), Jouy en Josas, France. <sup>4</sup> Institute of Clinical Chemistry and Clinical Pharmacology, University Hospital Bonn, Bonn, Germany.

### Contact information for the corresponding authors:

Philippe de Medina: [philippe.de-medina@inserm.fr](mailto:philippe.de-medina@inserm.fr)

Sandrine Silvente-Poirot : [sandrine.poirot@inserm.fr](mailto:sandrine.poirot@inserm.fr)

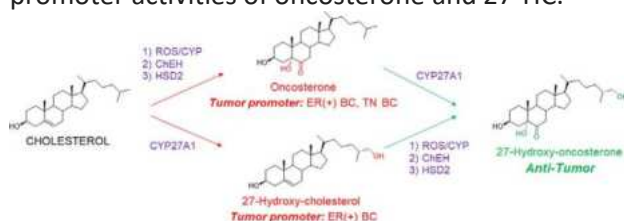
Marc Poirot : [marc.poirot@inserm.fr](mailto:marc.poirot@inserm.fr)

Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Inserm, CNRS, University of Toulouse, Team INOV: "Cholesterol Metabolism and Therapeutic Innovations", 2 avenue Hubert Curien, F-31037, Toulouse, France

**Short title:** CYP27A1 metabolizes OCDO and its precursors

### ABSTRACT

Oncosterone (6-oxo-cholestane-3 ,5 -diol; OCDO) is an oncometabolite and a tumor promoter on estrogen receptor alpha positive breast cancer (ER(+) BC) and triple negative breast cancers (TN BC). OCDO is an oxysterol formed in three steps from cholesterol: 1) oxygen addition at the double bond to give  - or  - isomers of 5,6-epoxycholestanols (5,6-EC), 2) hydrolyses of the epoxide ring of 5,6-ECs to give cholestane-3 ,5 ,6 -triol (CT), and 3) oxidation of the C6 hydroxyl of CT to give OCDO. On the other hand, cholesterol can be hydroxylated by CYP27A1 at the ultimate methyl carbon of its side chain to give 27-hydroxycholesterol (27HC), which is a tumor promoter for ER(+) BC. It is currently unknown whether OCDO and its precursors can be hydroxylated at position C27 by CYP27A1, as is the impact of such modification on the proliferation of ER(+) and TN BC cells. We investigated, herein, whether 27-hydroxylated-5,6-ECs, -CT and -OCDO exist as metabolites and can be produced by cells expressing CYP27A1. We report, for the first time, that these compounds exist as metabolites in human. We give pharmacological and genetic evidences that CYP27A1 is responsible for their production. Importantly, we found that 27-hydroxy-OCDO (27H-OCDO) inhibits BC cells proliferation and blocks OCDO and 27-HC induced proliferation in BC cells, showing that this metabolic conversion commutes the proliferative properties of OCDO into antiproliferative ones. These data suggest an unprecedented role of CYP27A1 in the control of breast carcinogenesis by inhibiting the tumor promoter activities of oncosterone and 27-HC.



**Key words:** CYP27A1, oxysterols, 5,6-epoxycholestanol, cholestane-3 ,5 ,6 -triol, oncosterone, metabolism, breast cancer.

## INTRODUCTION

Oxysterols constitute a growing family of oxygenated cholesterol metabolites that impact a plethora of fatal diseases including atherosclerosis, cancer, neurodegenerative diseases, and aging (1–4). Depending on their chemical structures, these metabolites exert distinct biological properties through various molecular mechanisms that could involve nuclear receptors (e.g., Liver-X-Receptor, LXR; retinoid-related orphan receptor, ROR; estrogen receptor alpha, ER $\alpha$ ; glucocorticoid receptor alpha, GR $\alpha$ ) (5–8), G-protein coupled receptors (e.g., smooth muscle, SMO; CXC-motif-chemokine receptor 2, CXCR2; Epstein-Barr virus-induced gene 2, EBV2) (9–13), enzymes (e.g., sterol O-acyltransferase/Acyl-coA cholesterol acyltransferase, SOAT/ACAT; cholesterol 5,6-epoxide hydrolase, ChEH; and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, HMG-CoAR; 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, (HSD2) (14–16), or transporters (e.g., ion transporters, insulin induced gene, INSIG; sterol or oxysterol binding proteins (ORP) proteins; Nieman-Pick C1 and C1 like 1, (NPC1 and NPC1L1)) (17, 18). Several studies highlight that the deregulation of the metabolism of oxysterols plays a pivotal role in the development of cancers more particularly breast cancers (BC) (1, 19–21). Indeed, two tumor promoters and one tumor suppressor were identified. 27-hydroxycholesterol (27HC) (Fig. 1A) is produced by CYP27A1 and is a tumor promoter in estrogen receptor alpha-positive BC (ER(+) BC). It is one of the major circulating side-chain oxysterol (16, 22, 23), but while its tumor promoter activity was established in mice (22, 23) an inverse association was found between high circulating 27HC level and breast cancer risk (19, 24–26). 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol (OCDO (Fig. 1B), (6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol or cholestan-6-oxo-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol, denoted oncosterone), is a B-ring oxysterol oncometabolite identified in BC and was reported to be a tumor promoter for ER(+) BC and triple-negative BC (TN BC) (5, 27, 28). Dendrogenin A (5 $\alpha$ -hydroxy-6 $\beta$ -[2-(1H-imidazole-4-yl)-ethylamino]-cholestan-3 $\beta$ -ol, DDA) (Fig. 1B) a B-ring oxysterol conjugate produced by healthy tissues including breast that was reported to display tumor suppressor properties (3, 27, 29–34). Oncosterone is a tertiary metabolite of cholesterol (Fig. 1B). Cholesterol is first epoxidized at the level of its delta-5,6 double bond to give 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxycholestan-3 $\beta$ -ol (5,6 $\alpha$ -EC) and 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxycholestan-3 $\beta$ -ol (5,6 $\beta$ -EC) (Fig. 1C) (35). This addition reaction can be done through lipid peroxidation or via cytochrome p450 (35). In cancer cells, 5,6-ECs are not metabolized into DDA but are mainly metabolized into cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT) by the ChEH (36, 37), which is next metabolized into OCDO by HSD2 (5, 28) (Fig. 1C). The expression levels of OCDO-forming enzymes (ChEH and HSD2) are upregulated in BC compared to normal adjacent tissues and their expression negatively correlated with patient survival (5, 38). The B-ring oxysterol 7-ketocholesterol was reported to be hydroxylated at position C27 by CYP27A1 to give 3 $\beta$ ,27-dihydroxy-5-cholesten-7-one (27H-7KC) (39) (Fig. 1D) suggesting that other B-ring oxysterols could be 27-hydroxylated by this enzyme. In the present study, we evaluated whether OCDO and its precursors can undergo a 27-hydroxylation in cancer cells expressing CYP27A1 and compared the proliferative properties of 27H-OCDO ((25R)-cholestan-6-oxo-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,26-triol) on ER(+) and TN BC cells with OCDO and 27HC. We show that OCDO, CT, and 5,6-ECs can be 27-hydroxylated by CYP27A1 and reveals a metabolic switching of the pro-tumor activity of OCDO to an anti-tumor activity in BC cells expressing CYP27A1 through the hydroxylation of OCDO at position C27.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

[4–14C]-cholesterol (52 mCi/mmol) was purchased from PerkinElmer. [4–14C]-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxycholestan-3 $\beta$ -ol, [4–14C]-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxycholestan-3 $\beta$ -ol, [4–14C]-cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol and [4–14C]-6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol were synthesized as previously described (15, 40, 41). (25R)-cholest-5-ene-3 $\beta$ ,26-diol (27-hydroxycholesterol; 27HC), cholest-5-ene-3 $\beta$ ,25-diol (25-hydroxycholesterol; 25HC), 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol (cholestan-6-oxo-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol, OCDO; oncosterone) was from Steraloids and bicalutamide and tamoxifen were from Sigma-Aldrich (Merck KGaA). Other chemicals were from Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). The advancement of the reactions was monitored by thin-layer chromatography (TLC) in conditions where reactants and products are separated on Merck silica gel 60 F254 (0.040–0.063 mm) plates. Reactants and products were revealed after spraying the

plates with sulfuric acid/methanol (1:1) and heating. The purification of newly synthesized compounds was performed by flash chromatography on a CombiFlash NextGen 300 (Serlabo, Entrai-gues sur la sorgues, France). <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on Bruker spectrometers (Avance III HD 400 MHz, 500 MHz or NEO 600 MHz, (Bruker BioSpin GmbH). Solutions of new compounds were prepared in deuterio-chloroform (CDCl<sub>3</sub>), deuterated acetone (acetone d<sub>6</sub>) or deuterated methanol (CD<sub>3</sub>OD). Deuterated solvents were from Euriso-top and were used as internal references. Mass determination of new compounds were recorded in positive mode on a DSQ II (Thermo Fisher Scientific) using chemical ionization (NH<sub>3</sub> as ionization gas). All the organic layers were dried using anhydrous MgSO<sub>4</sub>.

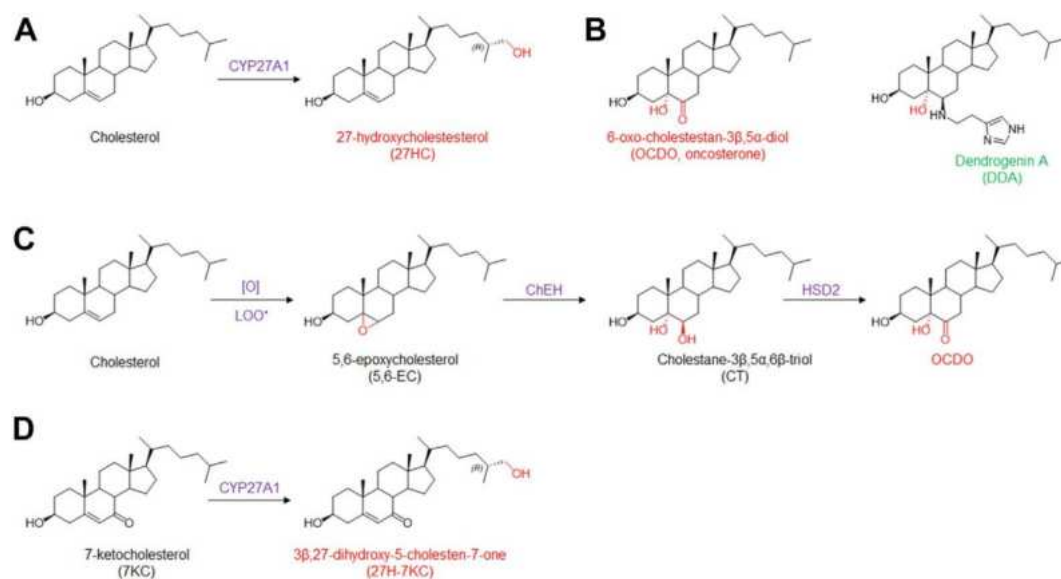


Fig. 1. A: chemical structure of cholesterol metabolites with tumor promoter properties in breast cancers (red) and tumor suppressor properties (green). Metabolic pathways leading to the production of OCDO (B), 27HC (C) and 27H-7KC (D). [O] and LOO represent respectively oxidative stress and lipid hydroperoxides radicals involved in the epoxidation of delta-5,6 double bond of cholesterol.

## Chemical syntheses

The chemical synthesis of the new compounds is summarized in Fig. 2. All compounds have been registered at LIPID MAPS® (<https://www.lipidmaps.org/>). Their ID is given as supplemental Data S1.

**Synthesis of (25R)-5,6-epoxycholestan-3β,26-diol (27H-5,6-EC).** To a solution of 27HC (40 mg; 0.1 mmol) in CHCl<sub>3</sub> (2 ml) a solution of meta-chloroperbenzoic acid (0.15 mmol; 1.5 equiv) in CHCl<sub>3</sub> (1 ml) was added. The mixture was stirred at room temperature (rt) for 2 h, diluted with 15 ml of chloroform, and washed sequentially with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10% aqueous solution [aq. sol.]), NaHCO<sub>3</sub> (5% aq. sol.) and brine (water saturated with NaCl). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated. The white crude product was purified by flash chromatography (CombiFlash NextGen) on a silica column (4G; column volume (CV) = 4.8 ml) using an ethyl acetate gradient in chloroform (0% EtOAc for 2 CV, then to 100% EtOAc in 15 CV and 100% EtOAc for 5 CV; flow rate = 13 ml/min) with elution at 15–16 CV. The mixture of 27H-5,6α-EC (83%) and 27H-5,6β-EC (17%) were obtained as an amorphous white solid (90% yield). R<sub>f</sub> (EtOAc) = 0.47. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3.87–3.90 (1H, m, H-3, α-isomer), 3.66–3.72 (1H, m, H-3, β-isomer), 3.48–3.51 (1H, m, H-27, isomers α+β), 3.39–3.43 (1H, m, H-27, isomers α+β), 3.05 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-6, β-isomer), 2.9 (1H, d, J = 4.4, H-6, α-isomer), 1.05 (3H, s, H-19, α+β-isomers), 0.88–0.91 (6H, d, H-26 and H-21, α and β isomers), 0.63



(3H, s, H-18,  $\beta$ -isomer), 0.6 (3H, s, H-19,  $\alpha$ -isomer). <sup>13</sup>C-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 69.58 (C-3,  $\beta$ -isomer), 68.89 (C-3,  $\alpha$ -isomer), 68.67 (C-27,  $\alpha$ + $\beta$  isomers), 65.82 (C-5,  $\alpha$ -isomer), 63.85 (C-6,  $\beta$ -isomer), 63.07 (C-5,  $\beta$ -isomer), 59.43 (C-6,  $\alpha$ -isomer), 56.99, 56.37, 56.33, 55.99, 51.47, 42.7, 42.49, 42.44, 42.38, 40.02, 39.56, 37.38, 36.24, 35.93, 35.82, 35.00, 33.65, 32.76, 32.54, 30.04, 29.92, 28.96, 28.331, 28.24, 24.32, 24.18, 23.55, 22.14, 20.79, 18.77, 18.74, 17.19, 16.63, 16.07, 12.01, 11.91. MS (DCI-NH<sub>3</sub>) m/z: 436.4 [M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]; 419.4 [MH<sup>+</sup>]; 401.4 [MH+-H<sub>2</sub>O]; 383.4 [MH+-2H<sub>2</sub>O].

*Synthesis of (25R)-cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,26-tetrol (27H-CT).* To a solution of 27H-5,6-EC (87%  $\alpha$  isomer; 13%  $\beta$  isomer determined by <sup>1</sup>H-NMR) (20 mg; 0.048 mmol) in 3.25 ml of tetrahydrofurane/water/acetone (v/v/v; 2:1:0.25) was added perchloric acid/tetrahydrofuran (0.25 ml). The mixture was stirred at room temperature for 30 min, diluted with 15 ml of butanol, and washed sequentially with NaHCO<sub>3</sub> (5% aq. sol.) and brine. The organic layer was dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated. The white crude product was solubilized in a minimum of methanol. 27H-CT was purified by flash chromatography on a silica column (12G column volume (CV) = 16.8 ml) using an acetone gradient in chloroform (0% acetone for 2 CV, then to 100% acetone in 15 CV and 100% acetone for 5 CV; flow rate = 30 ml/min) with an elution at 12–15 CV. 27H-CT was obtained as an amorphous white solid (38% yield). R<sub>f</sub> (EtOAc) = 0.1. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, acetone d<sub>6</sub>/ethanol d<sub>6</sub>)  $\delta$ H = 4.00 (m, 1H, H-3), 3.48 (Broad t, 1H, H-6), 3.36–3.39 (m, 1H, H-27), 3.27–3.30 (m, 1H, H-27), 1.5 (s, 3H, H-19), 0.92 (d, 3H, J = 6.6 Hz, H-21), 0.86 (d, 3H, J = 6.7 Hz, H-26), 0.69 (s, 3H, H-18). <sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, acetone d<sub>6</sub>/ethanol d<sub>6</sub>): 75.12 (C-6), 74.68 (C-5), 67.05 (C-27), 66.69 (C3), 56.34, 45.17, 42.61, 40.72, 40.22, 38.11, 36.11, 35.83, 34.50, 33.54, 32.27, 30.90, 30.34, 28.07, 24.01, 23.29, 21.02, 18.15, 16.11, 11.58. MS (DCI-NH<sub>3</sub>) m/z: 454.3 [M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]; 436.3 [M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O]; 418.3 [M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-2H<sub>2</sub>O]; 401.4 [MH+-2H<sub>2</sub>O].

*Synthesis of (25R)-cholestane-6-oxo-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,26-triol (27HOCDO).* 27H-CT (20 mg; 0.046 mmol) was dissolved in diethyl ether (4.5 ml), methanol (0.75 ml), and water (0.75 ml). N-bromosuccinimide (1.14 mmol; 25 eq) was added and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. Diethyl ether (15 ml) was added and the organic layer was washed with brine. Then, the aqueous layer was washed with CHCl<sub>3</sub>. Organic layers were pooled, dried under MgSO<sub>4</sub>, and evaporated. The crude product was purified by flash chromatography on a silica column (4G; column volume (CV) = 4.8 ml) using an ethyl acetate gradient in chloroform (0% EtOAc for 3 CV, then to 100% EtOAc in 20 CV and 100% EtOAc for 5 CV; flow rate = 13 ml/min) with an elution at 20–21 CV. 27H-OCDO was obtained as an amorphous white solid (65% yield). R<sub>f</sub> (EtOAc) = 0.39. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, acetone-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 3.92–3.96 (1H, m, H-3), 3.32–3.46 (2H, m, H-27), 2.78 (1H, t, J = 12.5 Hz, H-7), 0.96 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-21), 0.89 (3H, d, J = 6.7 Hz, H-26), 0.8 (3H, s, H-19), 0.71 (3H, s, H-18) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, acetone d<sub>6</sub>): 212.24 (C-6), 80.94 (C-5), 68.20 (C-27), 67.06 (C-3), 57.49, 57.17, 45.40, 44.01, 43.18, 42.49, 40.82, 38.23, 37.17, 37.09, 36.86, 36.62, 34.58, 31.65, 30.84, 28.94, 24.71, 24.32, 22.31, 19.16, 17.20, 14.41, 12.51. MS (DCI-NH<sub>3</sub>) m/z: 452.4 [M + NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]; 434.4 [M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O].

*Synthesis of 5,6-epoxycholestan-3 $\beta$ ,25-diol (25H-5,6-EC).* 25H-5,6-EC was produced as described for the chemical synthesis of 27H-5,6-EC starting from commercially available 25HC. 25H-5,6-EC was obtained as an amorphous white solid (90% yield). R<sub>f</sub> (EtOAc) = 0.47. <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 3.87–3.93 (1H, m, H-3,  $\alpha$ -isomer), 3.66–3.72 (1H, m, H-3,  $\beta$ -isomer), 3.05 (1H, d, J = 2.3 Hz, H-6,  $\beta$ -isomer), 2.9 (1H, d, J = 4.4, H-6,  $\alpha$ -isomer), 1.06 (3H, s, H-19,  $\alpha$ + $\beta$ -isomers), 0.9–0.91 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-21,  $\alpha$  and  $\beta$  isomers), 0.64 (3H, s, H-18,  $\beta$ -isomer), 0.61 (3H, s, H-18,  $\alpha$ -isomer). <sup>13</sup>C-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 71.12 (C-25), 69.46 (C-3,  $\beta$ -isomer), 68.76 (C-3,  $\alpha$ -isomer), 65.68 (C-5,  $\alpha$ -isomer), 63.71 (C-6,  $\beta$ -isomer), 62.93 (C-5,  $\beta$ -isomer), 59.29 (C-6,  $\alpha$ -isomer), 56.85, 56.23, 56.13, 55.81, 51.13, 44.4, 42.56, 42.37, 42.32, 42.25, 39.88, 39.84, 39.42, 37.24, 36.41, 35.73, 35.69, 34.87, 32.62, 32.41, 31.12, 31.07, 29.91, 29.78, 29.39, 29.33, 29.23, 29.19, 28.83, 28.17, 28.10, 24.19, 24.05, 22.00, 20.81, 20.74, 20.65, 18.65, 18.62, 17.06, 15.94, 11.87, 11.77. MS (DCI-NH<sub>3</sub>) m/z: 436.4 [M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]; 419.4 [MH<sup>+</sup>]; 401.4 [MH+-H<sub>2</sub>O]; 383.4 [MH+-2H<sub>2</sub>O].

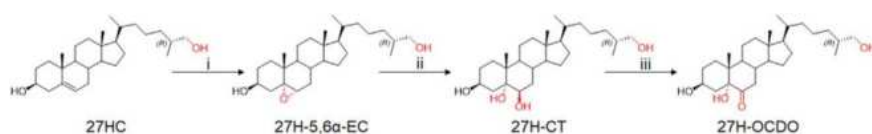


Fig. 2. Synthesis of 27H-5,6 -EC, -CT and -OCDO. i: 1.5 equiv mCPBA, CHCl<sub>3</sub>, rt, 3 h (90%); ii: HClO<sub>4</sub>, THF/H<sub>2</sub>O/acetone, rt, 30 min (38%); iii: 25 equiv NBS, diethylether/MeOH/H<sub>2</sub>O, rt, 3 h (65%).

**Synthesis of cholestane-3 ,5 ,6 ,25-tetrol (25H-CT).** 25H-CT was produced as described above for the chemical synthesis of 27H-CT starting from 25H-5,6-EC. The reaction mixture was maintained at 0 C rather than room temperature. 25H-CT was obtained as an amorphous white solid (25% yield). R<sub>f</sub> (EtOAc) = 0.1. <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ H (ppm) = 4.01 (m, 1H, H-3), 3.45 (t, 1H, H-6), 1.17 (s, 6H, H-26 and H-27), 1.16 (s, 3H, H-19), 0.95 (d, 3H, J = 6.5 Hz, H-21), 0.71 (s, 3H, H-18). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ C = 76.76 (C-5), 76.45 (C-6), 71.45 (C-25), 68.27 (C3), 57.59, 57.38, 46.50, 45.26, 43.87, 41.42, 41.35, 39.24, 37.07, 35.20, 33.42, 31.60, 31.54, 29.29, 29.24, 29.10, 25.16, 22.25, 21.82, 19.20, 17.29, 12.60. MS (DCI-NH<sub>3</sub>) m/z : 454.3 [M+ NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]; 436.3 [M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O]; 418.3 [M+NH +2H<sub>2</sub>O]; 401.4 [MH+2H<sub>2</sub>O].

**Synthesis of cholestane-6-oxo-3 ,5 ,25-triol (25H-OCDO).** 25H- OCDO was produced as described above for the chemical synthesis of 27H-OCDO starting from 25H-CT to give the expected product as a white amorphous solid (65% yield). R<sub>f</sub> (EtOAc) = 0.39. <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, acetone d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 3.89–3.96 (1H, m, H-3), 2.76 (1H, t, J =12.5 Hz, H-7), 1.14 (6H, s, H26 and H-27), 0.96 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-21), 0.78 (3H, s, H-19), 0.7 (3H, s, H-18) ppm. <sup>13</sup>C-NMR (500 MHz, acetone d<sub>6</sub>): 212.24 (C-6), 80.95 (C-5), 70.24 (C-25), 67.08 (C-3), 57.51, 57.21, 45.45, 45.43, 44.04, 43.20, 42.52, 40.86, 38.25, 37.58, 37.22, 36.75, 31.69, 30.86, 28.96, 24.73, 22.33, 21.64, 19.20, 17.20, 14.42, 12.52. MS (DCI-NH<sub>3</sub>) m/z: 435.4 [MH<sup>+</sup>]; 452.4 [M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>].

## Cell culture

MCF7 (human ER(+) BC), MDA-MB-231 (human TN BC, MDA-231), MDA-MB-468 (human TN BC, MDA-468) and HepG2 (human hepatoblastoma) cells were from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured until passage 30, HepG2 cells until passage 50. HEK293FT (R7007) were from Thermo Fisher Scientific and were maintained in DMEM (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% FBS, 0.1 mM MEM non-essential amino acids, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1% penicillin/streptomycin, and 500  g/ml geneticin. Cell lines were tested once a month for mycoplasma contamination using Mycoalert  Detection Kit (Lonza, Basel, Switzerland). MCF7 and MDA-468 cells were grown in RPMI 1640 medium (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 5% and 10% FBS (Dutscher) respectively. MDA-231 and HepG2 cells were grown in DMEM and EMEM respectively (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% FBS. For 27HC treatments cells were grown in a medium without phenol red. All cell media were supplemented with penicillin and streptomycine (50 U/ml each). Cell lines were cultured in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37 C.

## Side-chain cholesterol hydroxylase expression analysis

CYP27A1 gene expression analysis for different tissues from patients was downloaded from the Genotype-Tissue Expression (GTEx) database (GTEx Portal). CYP27A1, CH25H, and CYP46A1 expression on paired normal adjacent tissues, breast cancer, and metastasis, data were retrieved from the TNM plot database (TNMplot) (42). The human protein Atlas database was used for the analysis of CYP27A1, CH25H, and CYP46A1 expression in cancer cell lines (<https://www.proteinatlas.org/>).

## Prognosis value of HSD2 and CYP27A1 expression on breast cancer

Correlation between breast cancer patient survival and the mRNA expression of HSD2 (HSD11B2) (probe: 204,130\_at), CYP27A1 (probe: 203,979\_at), and the combination of both genes was analyzed with the KM plotter database (<https:// kmplot.com/>) (43) with recurrence-free survival (RFS) as end



point. Auto select best cut-off was chosen in the analysis. A total of 3951 breast cancer samples (all breast cancer) or 1161 patients (ER-negative breast cancer) from 50 individual datasets were split in high and low groups according to the cutoff value. The hazard ratio with 95% confidence intervals and log rank P value was calculated and significance was set at  $P < 0.05$ .

### Immunoblotting

For electrophoresis, cell lysate samples were denatured with NuPAGE LDS sample buffer and reducing agent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 70 C for 10 min and run on 10% Bis-Tris precast gels (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using NuPAGE MOPS SDS running buffer at 150 V for 1h20 min. For immunostaining and after gel electrophoresis, the proteins were transferred onto a PVDF membrane via semi-dry Western blotting at 25V for 2 h, blocked for 1 h at room temperature with 5% BSA in TBS-T (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% Tween 20) and stained with a monoclonal antibody against CYP27A1 (ab126785, Abcam, Cambridge, UK) diluted 1:1000, followed by the secondary anti-rabbit HRP-conjugated antibody (W401B, Promega), diluted 1:10.000 in 5% BSA TBS-T. After each incubation, the membrane was washed 3 times for 5 min with TBS-T, and finally developed with Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad) for 5 min.

### Metabolism of sterols in cells

Cells were plated into six-well plates ( $1 \times 10^5$  cells per well for MDA-231 and HepG2 or  $1.5 \times 10^5$  cells per well for MCF7 and MDA-468) in the appropriate complete medium. One day after seeding, this medium was replaced with a complete medium, and cells were treated with 1  $\mu$ M of either [14C]-5,6 $\beta$ -EC, [14C]-5,6 $\alpha$ -EC with or without 2.5  $\mu$ M tamoxifen. [14C]-CT (26 mCi/mmol) or [14C]-OCDO (26 mCi/mmol) for 24, 48 or 72 h. After incubation, media were collected and cells were washed, trypsinized, and counted. Lipids were extracted from both cells and media with a chloroform-methanol mixture as described previously (44). Radioactivity from organic and aqueous layers was measured using a  $\beta$ -counter. Lipids were then separated by TLC using as the eluent ethyl acetate for [14C]-5,6 $\beta$ -EC, [14C]-5,6 $\alpha$ -EC, [14C]-CT and [14C]-OCDO or hexane/ethyl acetate for [14C]-cholesterol. The radioactive sterols were revealed by autoradiography. For quantification, silica zones at the expected R<sub>f</sub> values corresponding to authentic chemical standards were scraped and radioactivity was measured using a  $\beta$ -counter, as previously described (15).

### Pharmacological inhibition of CYP27A1

Cells were plated into six-well plates ( $1 \times 10^5$  cells per well for MDA-231) in the appropriate complete medium. One day after seeding, this medium was replaced with a complete medium, and cells were treated with 1  $\mu$ M [14C]-CT (26 mCi/mmol) alone or in the presence of 10  $\mu$ M bicalutamide. Metabolic studies were performed as described above.

### GC-MS analysis

MCF7 cells were plated in 100 mm tissue culture plates at a density of  $0.5 \times 10^6$  cells per plate. Cells were allowed to adhere for 24 h and were treated by 1  $\mu$ M of 5,6 $\alpha$ -EC, 5,6 $\beta$ -EC, 27H-5,6EC (83% isomer  $\alpha$ , 17% isomer  $\beta$ ) with or without 2.5  $\mu$ M tamoxifen, CT or 27H-CT for 72 h. Cell pellets were dried in a SpeedVac Savant AES 1999, DNA 130–230 (Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany) and dried cells were weighed. 10  $\mu$ l epi-coprostanol (100  $\mu$ g/ml dissolved in cyclohexane; Medical Isotopes Pelham, U.S.A.) as internal standard was added. 9 ml medium was reduced in a heating block under a gentle stream of nitrogen at 60 C to a final volume of about 0.5 ml. Prior to work-up 10  $\mu$ l epicoprostanol (100  $\mu$ g/ml dissolved in cyclohexane) was added as internal standard. After alkaline hydrolysis (addition of 1 ml of a 90% ethanolic NaOH) all free total sterols and oxysterols were extracted by addition of 3 ml cyclohexane (2 times) and silylation of hydroxyl groups was performed at 100 C after addition of a silylation reagent (Pyridine: Hexamethyldisilazane: Chlortrimethylsilane; 9:3:1). The TMSi-ethers were evaporated under a gentle stream of nitrogen at 100 C and the residue was dissolved in 30  $\mu$ l n-decane. The same procedure was performed for all synthesized purified compounds for structural identification. First, structural identification of the synthesized standards was performed using

gas chromatography - mass spectrometry in the scan mode ( $m/z$ : 150–700). Semi-Quantification of the above described isolated cell and medium TMSi-ethers was performed by gas chromatography- mass spectrometry in the selected ion monitoring mode using the characteristic ions for the individual compounds as listed in Table 1. We used the ratios between the areas of corresponding sterol/oxysterol and the internal standard epicoprostanol. The silylated sterols and oxysterols were separated on a DB-XLB (30 m length  $\times$  0.25 mm internal diameter, 0.25  $\mu$ m film) column (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) using the 6890N Network GC system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Scans and selected ion monitoring were performed on a 5973 Network MSD (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The mass spectrometer was operated in the electron impact ionization mode. Gas chromatographic conditions were as follows: 2  $\mu$ l sample was injected in the splitless mode (inlet was kept at 280°C with the helium flow at 1.1 ml/min)- The oven was first kept at 150°C for 3 min, ramped at 30°C/min to 290°C and held for 27.5 min (45, 46).

TABLE 1. Retention times of the individual trimethylsilylated compounds and selected ions used for quantification in the method

Compound	retention time (min)	Quantifier ion ( $m/z$ )	Selected ion ( $m/z$ )
Epicoprostanol (ISTD)	14.43	370 [M-TMSiOH] <sup>+</sup>	370
5,6�-EC	18.2	384 [M-TMSiOH] <sup>+</sup>	384, 474
5,6�-EC	18.9	384 [M-TMSiOH] <sup>+</sup>	384, 474
OCDO	19.0	562 [M] <sup>+</sup>	472, 562
CT	20.3	456 [M-H <sub>2</sub> O-TMSiOH] <sup>+</sup>	456, 546
27H-5,6�-EC	28.2	562 [M] <sup>+</sup>	472, 562
27H-5,6�-EC	29.5	562 [M] <sup>+</sup>	472, 562
27H-OCDO	31.5	650 [M] <sup>+</sup>	560, 650
27H-CT	32.2	544 [M-H <sub>2</sub> O-TMSiOH] <sup>+</sup>	544, 634
25H-5,6�-EC	25.3	562 [M] <sup>+</sup>	472, 562
25H-5,6� EC	26.5	562 [M] <sup>+</sup>	472, 562
25H-OCDO	28.3	650 [M] <sup>+</sup>	560, 650
25H-CT	29.5	544 [M-H <sub>2</sub> O-TMSiOH] <sup>+</sup>	544, 634

### Lentiviral sh-RNA transduction

The plasmids pGFP-C-shLenti encoding shCY- P27A1(TL313602) were from OriGene (OriGene Technologies GmbH, Herford, Ge). HEK293FT cells were seeded on T75 flasks. 24 h later 80% confluence HEK293FT cells were cotransfected with 10  $\mu$ g of the pGFP-C-shLenti transfer plasmid, 10  $\mu$ g of the p8.91 packaging plasmid and 5  $\mu$ g of the pVSVg envelope plasmid using the calcium phosphate method. 6 h after transfection, the medium was replaced by 12 ml of OptiMEM medium (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Twenty six h after transfection, the conditioned medium was collected, cleared by centrifugation and filtered through 0,45  $\mu$ m- pore-size PVDF filters. The lentiviral pellet was resuspended in PBS and stored at –80°C. The cell lines MDA-231-TL313602 stably expressing shCYP27A1 (29 mer shRNA constructs against hCYP27A1 in lentiviral GFP (cat# TL313602, Origene, Rockville, MD, USA): A) TL313602A: 5'CAGGTGTCTGGCTACCTGCAC TTCTTACT3'; B) TL313602C: 5'AACCAGGTGTCGGACATGG CTCAACTCTT3'; C) TL313602D: 5'GGCAACGGAGCTTAGA GGAGATTCCACGT3', or shCont were generated by lentiviral infection. The concentrated lentivirus supernatant was aliquoted and kept at –80°C before use. For transduction experiments, MDA-231 cells were seeded onto 12-well plates (30,000 cells per well) and incubated for 24 h at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in DMEM 10% FBS without antibiotics. The concentrated viral supernatant containing lentivirus that express shRNA targeting CYP27A1 (shCYP27A1-A, B and C) or non specific shRNA (sh-Control) were added into the culture medium at a multiplicity of infection (MOI) of 20 in the presence of protamine sulfate (5  $\mu$ g/ml). One day after transduction, this medium was replaced with complete medium. After 72 h, puromycin was added to the medium at 1  $\mu$ g/ml for stable CYP27A1 knock-down selection. For metabolic studies, MDA-231-shControl, shCYP27A1-A, sh-CYP27A1-B, and sh- CYP27A1-C were plated into six-well plates (1x10<sup>5</sup> cells per well) in the appropriate complete medium. One day after seeding, this medium was replaced with a complete medium, and cells were treated with 1  $\mu$ M [4–14C]-

OCDO (26 mCi/mmol), [4-<sup>14</sup>C]-CT (26 mCi/mmol) or [4-<sup>14</sup>C]-5,6 -EC (26 mCi/mmol) alone or in the presence of 2.5  M tamoxifen for 48 h. Metabolic analyses were performed by TLC as described above. Production and cells transductions were fulfilled in the “Plateau de Vectorologie, at the “Po le Technologique du CRCT” (Toulouse, France).

### Statistical analysis

Data are given as mean   standard error of the mean (S.E.M) of three independent experiments each carried out in duplicate. Statistical analysis was carried out using the Student's t test for unpaired variables. \*, \*\*, \*\*\* and \*\*\*\* in the figures refer to statistical probabilities (P) of <0.05, <0.01, <0.001 and <0.0001, respectively. GraphPad Prism 9.0 software was used for all the statistical analyses.

## RESULTS

### CYP27A1 expression in breast cancer cell lines

Aiming to investigate the metabolic transformation by 27-hydroxylation of oncosterone and its precursors (5,6 -EC, 5,6 -EC, and CT), we first evaluated the expression of CYP27A1 in normal mammary tissue, breast cancer and human breast cancer cell lines through the analyses of transcriptomic databases (GTEx and TNM plot). CYP27A1 is mainly expressed in the liver (332.1 TPM, n = 226) but also in several others tissues including normal mammary tissue (47.47 TPM, n = 459) (Fig. 3A). As previously reported (40), the analysis of transcriptomic database (TNMplot) showed that CYP27A1 is expressed in breast cancer in paired tumors (n = 7569), adjacent normal breast tissues (n = 252) and metastasis (n = 82), showing a slight decrease between normal and cancer tissues (median fold change tumor/normal = 0.87; median fold change

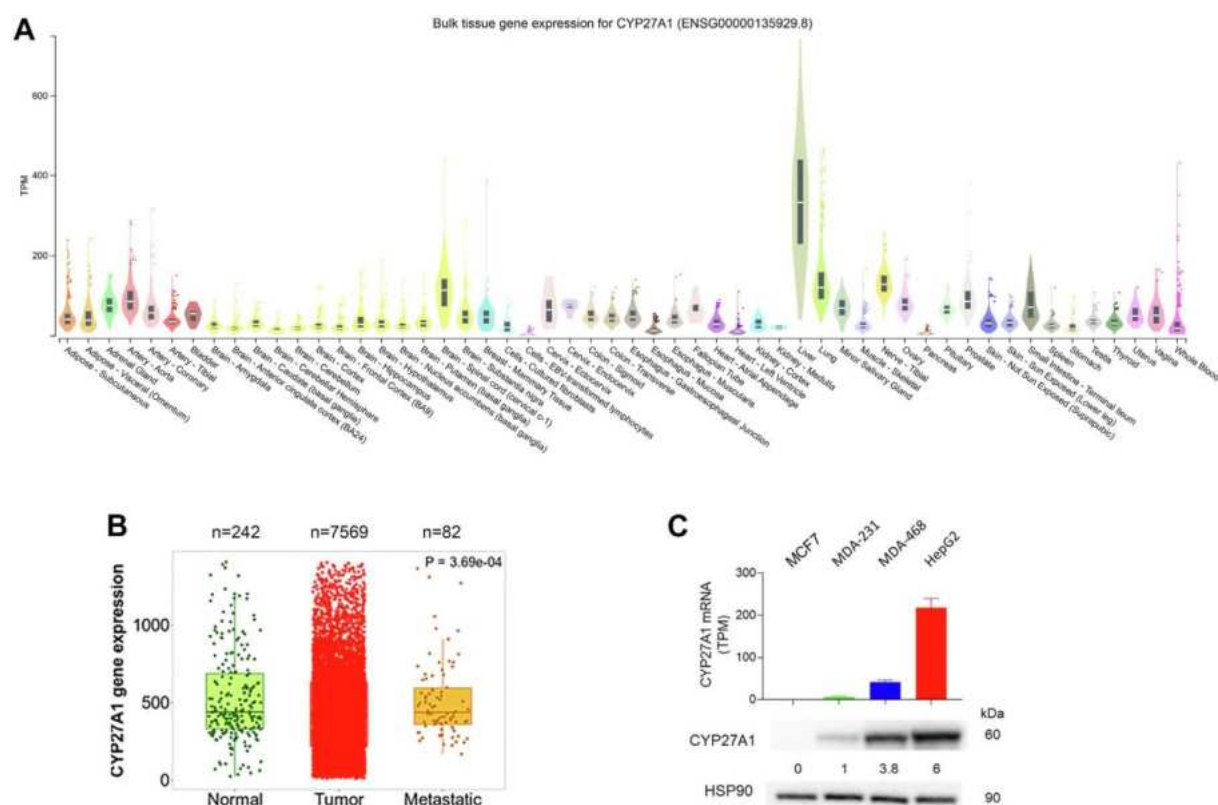


Fig. 3. Expression of CYP27A1. A: Violin plots of bulk tissue gene expression of CYP27A1 (transcript per million; TPM) from the analysis of the transcriptomic database GTEx (GTEx Portal). B: Box plots of CYP27A1 gene expression by gene chip data in breast cancer when comparing paired normal adjacent tissue (n = 242), tumor (n = 7569) and metastasis (n = 82) with the transcriptomic database TNM plot (<https://tnmplot.com>). C) CYP27A1 gene expression (transcript per million; TPM) on human

breast cancer cell lines MCF7, MDA-231, MDA-468 and in the human hepatoblastoma cell line HepG2. Transcriptomic data were retrieved from the Human Protein Atlas database (<https://www.proteinatlas.org/>). Immunoblot of CYP27A1 protein expression in MCF7, MDA-231, MDA-468 and HepG2 cells. Western Blots are representative of three independent experiments.

metastatic/tumor = 0.98) (Fig. 3B). The cell lines used in our studies were chosen because they were reported to express CYP27A1 at various mRNA levels (<https://www.proteinatlas.org/>), and we confirm that at the protein level by western blotting (Fig. 3C). The order for CYP27A1 expression was found as follow MCF7 (no expression) < MDA-231 < MDA-468 < HepG2 (Fig. 3C).

### **The HepG2 cell line is a hepatoblastoma cell line that**

was used as a positive control known to metabolize oxysterols (47, 48). CH25H was found weakly expressed at the mRNA level in MDA-231 (<https://www.proteinatlas.org/>: TPM 1.2) while CYP46A1 was only detected at a very low level in MCF7 cells (<https://www.proteinatlas.org/>: TPM 0.3) (supplemental Table S1). These data show CYP27A1 is widely expressed in human breast tumors while its expression can vary from null expression to high expression in cancers cell lines showing that the selected cell lines represent good in vitro models to study the 27-hydroxylation of sterols.

### **Metabolism of OCDO, CT, and 5,6-EC in cancer cell lines**

We first examined the metabolism of [4-14C]-5,6 $\alpha$ -EC, [4-14C]-5,6 $\beta$ -EC, [4-14C]-CT and [4-14C]-OCDO over a 72-h period in the BC cell lines, MCF7, MDA-231, MDA-468 and in the hepatoblastoma cell line HepG2. Metabolic analyses were performed by thin-layer chromatography (TLC) analyses of lipidic extracts from cells and media. 25- and 27-hydroxylated synthetic compounds were used as chemical standards for the investigation of the biogenesis of side-chain hydroxylated metabolites formed from radiolabelled precursors.

*Metabolism of OCDO.* As expected in CYP27A1 positive cells (MDA-231, MDA-468, and HepG2), OCDO is converted into a compound ( $R_f$  = 0.39) that comigrates with authentic 27H-OCDO, while no production was observed in MCF7 that do not express CYP27A1 (Fig. 4A). This compound was named sc-OCDO because we cannot rule out that a 25H-OCDO, which co-migrates with 27H-OCDO, could be formed in MDA-231. MDA-231 are expressing CH25H although at a low level (1.2 TPM, see supplemental Table S1). Sc-OCDO was not detected in cell extracts (data not shown) but only in culture media extracts from CYP27A1 expressing cells (Fig. 4A). In addition, we observed the appearance in the medium from MDA-468 and HepG2 of more polar OCDO metabolites than sc-OCDO (Fig. 4B). Together these data showed that CYP27A1(+) cell lines secrete a metabolite of OCDO (sc-OCDO) that comigrates with authentic 27H-OCDO and which is not produced by the CYP27A1(−) MCF7 cells.

*Metabolism of CT.* When CT was used as a substrate, we observed the production of OCDO in all tested cell lines as previously reported (5) (Fig. 4C). Both the biogenesis of sc-OCDO and sc-CT ( $R_f$  = 0.1) was visualized in the culture media from CYP27A1 expressing cells (Fig. 4C–E). Sc-CT was not observed in the CYP27A1(−) cells MCF7. These data showed that CYP27A1 expressing cells are secreting sc-CT that is likely to correspond to 27H-CT.

*Metabolism of 5,6-EC.* Both 5,6 $\alpha$ -EC and 5,6 $\beta$ -EC are hydrolyzed by ChEH to provide CT (5, 15, 36, 37) that is next oxidized into OCDO by HSD2 (5). sc-5,6 $\alpha$ -EC or sc-5,6 $\beta$ -EC were not produced by CYP27A1 expressing

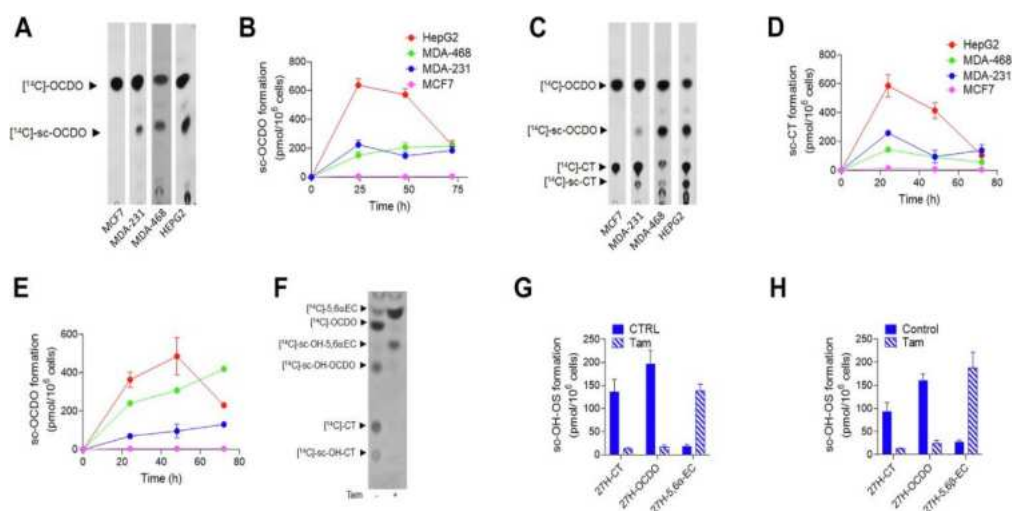


Fig. 4. Representative TLC autoradiograms and quantitative analyses ( $n = 5$ ) of lipidic extracts from cell media from cells treated with  $1 \mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-OCDO (A, B), [ $^{14}\text{C}$ ]-CT (C–E) for 48 h and with  $1 \mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-5,6 $\alpha$ -EC (F, G) or 5,6 $\beta$ -EC (H) alone or in the presence of  $2.5 \mu\text{M}$  of tamoxifen (Tam) for 72 h. Side-chain hydroxylated OCDO (sc-OCDO), sc-CT and sc-5,6-ECs co-migrates with their synthetic 25H- and 27H counterparts. For quantification, the region corresponding to sc-OCDO, sc-CT and sc-5,6-EC were recovered and counted using a  $\beta$ -counter. Results are the mean ( $\pm$ SEM) of five independent experiments.

cells in our conditions while sc-CT and sc-OCDO were present. This shows that sc-5,6 $\alpha$ -EC or sc-5,6 $\beta$ -EC are rapidly consumed by ChEH (Fig. 4F–H). When the ChEH inhibitor tamoxifen (15) and 5,6-ECs were co- incubated with cells, 5,6-ECs were not further metabo- lized into CT and OCDO, leading to the accumulation of 5,6 $\alpha$ -EC and 5,6 $\beta$ -EC and sc-5,6EC ( $R_f = 0.47$ ; Fig. 4F–H), indicating that the 5,6-ECs are hydroxylated in their side chain (Fig. 4F). Together, our data show that 5,6-EC, CT and OCDO can undergo side chain hydroxylation in CYP27A1(+) cells (MDA-231, MDA- 468 and HepG2) but not in the CYP27A1(–) cell line MCF7.

### Characterization and quantification of 27-hydroxylated metabolites by GC-MS

We next investigated the nature of the side chain hydroxylated metabolite produced CYP27A1-positive cell lines by GC-MS. While there was no doubt that 27H-OCDO was produced as a single sc-OCDO metabolite by MDA-468 and HepG2, MDA-231 cells expressed CH25H in addition to CYP27A1 opening up the possibility that 25H-OCDO and its precursors 25H- 5,6-EC and 25H-CT could be produced. Chemical standards were derivatized to their trimethylsilyl (TMS) ethers and analyzed by GC-MS as previously reported (45). We found that TMS ethers of 27H-5,6 $\alpha$ -EC, 27H- 5,6 $\beta$ -EC, 27H-CT, and 27H-OCDO are well resolved from their 25-hydroxylated counterparts (Table 1). Figure 5A shows the GC profile for 27H-5,6 $\alpha$ -EC, 27H- 5,6 $\beta$ -EC, 27H-CT and 27H-OCDO. The MS spectra corresponding to the 4 compounds are given on supplemental Figs. S1–S4. The GC profile of 25H- compounds and their MS spectra are given on supplemental Figs. S5–S9. Retention time and characteristic  $m/z$  data are given in Table 1. One fragment



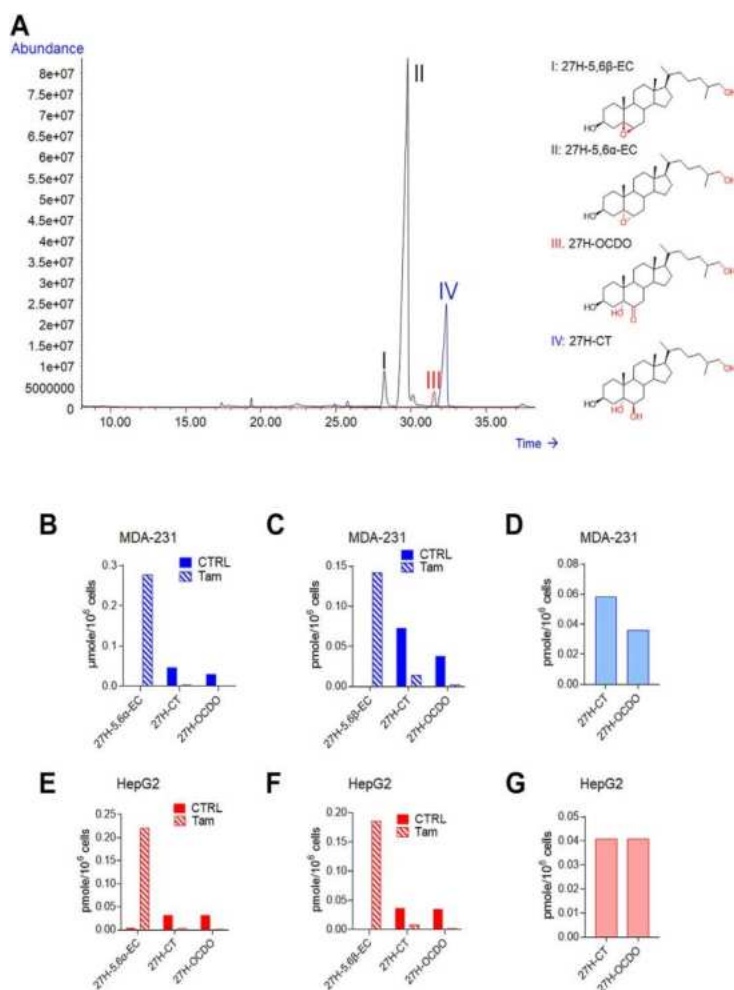


Fig. 5. Total ion chromatogram (TIC) of the trimethylsilyl ethers (TMS) of the chemical standards including 27H-5,6 -EC (I), 27H-5,6 -EC (II), 27H-OCDO (III) and 27H-CT (IV) in full scan mode in the range of 50–750 m/z (A). GC-MS quantification of 27H- 5,6 -EC, 27H-5,6 -EC, 27H-CT and 27H-OCDO in the media of MDA-231 and HepG2 cells treated for 72 h with 1  M of 5,6 -EC (B, E), 5,6 -EC (C, F) with or without 2.5  M tamoxifen (Tam) or with 1  M of CT (D, G).

ion for each chemical standard was selected for quantification by gas chromatography–mass spectrometry selected ion monitoring method and one to two more as qualifier ions (Table 1). Then, MCF7 cells (CYP27A1(–)), MDA-231 (CYP27 A1(+)) and HepG2 and MDA-468 (CYP27A1(++)) cells were exposed for 72 h to CT, 5,6 -EC and 5,6 -EC with or without the ChEH inhibitor tamoxifen. Lipid extracts from cell media were derivatized by trimethylsilylation and analyzed by GC-MS-SIM as described in Materials and Methods. As expected, 27H metabolites were not found in the CYP27A1(–) cell line MCF7, whereas both 27H-CT and 27H-OCDO were detected and quantified in the culture media of MDA-231 and HepG2 cells incubated with 5,6 -EC (Fig. 5B, E), 5,6 -EC (Fig. 5C, F) and CT (Fig. 5D, G). 27H-5,6 -EC or 27H-5,6 -EC were not detected in cells exposed to 5,6 -EC or 5,6 -EC respectively, except when co-incubated with tamoxifen. In that case a strong decrease in 27H-CT and 27H-OCDO levels was observed and 27H-5,6 -EC appeared (Fig. 5B, C, E, F). These data are consistent with TLC analyses evidencing that ChEH inhibition is required to accumulate 27H-5,6 -EC and 27H-5,6 -EC. It is worthnoting that 25-hydroxylated metabolites were not detected in the cell lines used in this study. These results are in good accordance with the analysis of transcriptomic database (<https://www.proteinatlas.org/>) showing that MCF7, MDA-468 and HepG2 cells do not express the cholesterol-25-hydroxylase (CH25H), while MDA-231 expressed weakly CH25H (1.2 TPM) (supplemental Table S1). Altogether, these experiments give the first evidence of the existence of 27H-

5,6 -EC, 27H-5,6 -EC, 27H-CT and 27H-OCDO as newly identified metabolites produced in CYP27A1 expressing cells.

### 27H-CT is oxidized by HSD2 into 27H-OCDO

We showed by TLC analyses that 27H-OCDO arises from direct 27-hydroxylation of OCDO (Fig.4A, B). We then explored whether 27H-OCDO can also be produced by the oxidation of 27H-CT catalyzed by HSD2. We found that 27H-CT inhibited in a dose-dependent manner the conversion of [4-14C]-CT into [4-14C]-OCDO with an IC<sub>50</sub> of 2.1  $\mu$ M (Fig. 6A, B). Lineweaver-Burk analysis show that the V<sub>max</sub> is unchanged with increasing concentrations of the inhibitor (27H-CT), which is the characteristic of a competitive inhibitor. This is confirmed through a Dixon analysis (K<sub>i</sub> = 2.3  $\mu$ M) (Fig. 6C, D). Therefore, 27H-CT compete with CT on the catalytic site of HSD2 involved in OCDO biosynthesis. We then evaluated by GC-MS the metabolism of 27H-CT on MDA-231 and HepG2 cells. For this purpose, cells were treated for 72 h with 27H-CT and lipidic extracts from cell media were analyzed by GC-MS-SIM as described in Materials and Methods. We observed that CYP27A1-positive cell lines metabolized 27H-CT into 27H-OCDO (Fig. 6E, F). Consequently, besides direct 27-hydroxylation, 27H-OCDO can also be produced from the oxidation of 27H-CT catalyzed by HSD2.

### Metabolism of 27H-5,6-EC and 27H-CT

Metabolic studies performed by TLC and GC-MS analyses demonstrate that 27H-5,6 -EC and 27H-5,6 -EC arise from direct 27-hydroxylation of 5,6  and 5,6 -EC respectively (Figs. 4F-H and 5). We next tested whether or not 27H-CT can also be produced by ChEH by hydrolysis of 27H-5,6-EC. MDA-231 and HepG2 cells, were treated for 72 h with 27H-5,6-EC with or without the ChEH inhibitor tamoxifen (15). Lipidic extracts from cell media were analyzed by GC-MS-SIM as described in Materials and Methods. We observed that CYP27A1-positive cell lines metabolized 27H-5,6-ECs into 27H-CT in MDA-231 (Fig. 6G) and HepG2 cells (Fig. 6H). 27H-CT is then oxidized into 27H-OCDO (Fig. 6G, H). The inhibition of ChEH by tamoxifen blocked the formation of both 27H-CT and 27H-OCDO leading to the accumulation of 27H-5,6 -EC and 27H-5,6 -EC. These data show that 27H-5,6-ECs are substrates of ChEH to produce 27H-CT.

### CYP27A1 drives the 27-hydroxylation of OCDO and its precursors

CYP27A1 is well described as the enzyme involved in 27-hydroxylation of cholesterol (49), of cholesterol precursors (50) and of the B-ring oxysterol 7-Ketocholesterol (39, 51). Consequently, we have postulated that CYP27A1 could catalyze the biogenesis of 27H-5,6-EC, 27H-CT and 27H-OCDO from 5,6-EC, CT and OCDO respectively. The research group of Pikuleva has identified bicalutamide, as a potent inhibitor of CYP27A1 for 27HC biosynthesis (52, 53). Therefore, to confirm this hypothesis, we evaluated the impact of these compounds on the 27-hydroxylation of CT. For this purpose, MDA-231 and HepG2 cells were treated with [14C]-CT alone or in the presence of 10  $\mu$ M bicalutamide. Lipidic extracts from cell media were then analyzed by TLC at the indicated time. Bicalutamide significantly reduced by approximately 60% and 40% the production of these 27-hydroxylated metabolites in MDA-231 (Fig. 7A, B) and HepG2 cells (Fig. 7C, D) respectively. These data show that the pharmacological inhibition of CYP27A1 blocked the production of 27H-CT and OCDO. To get more insight into the role of CYP27A1 in the biogenesis of 27H-5,6-EC, 27H-CT, and 27H-OCDO, MDA-231 cells were transduced with three different lentivirus-shRNA against CYP27A1 (shCYP27A1-A, B and C) or with lentiviral vector carrying control non-specific sh-RNA (shControl). CYP27A1 protein level was strongly reduced in the MDA-231 cells upon treatment with the CYP27A1-targeting lentivirus (MDA-231-shCYP27A1-A, B, and C) compared to MDA-231-shControl as determined by immunoblot analysis (Fig. 8A). Metabolic studies showed that CYP27A1



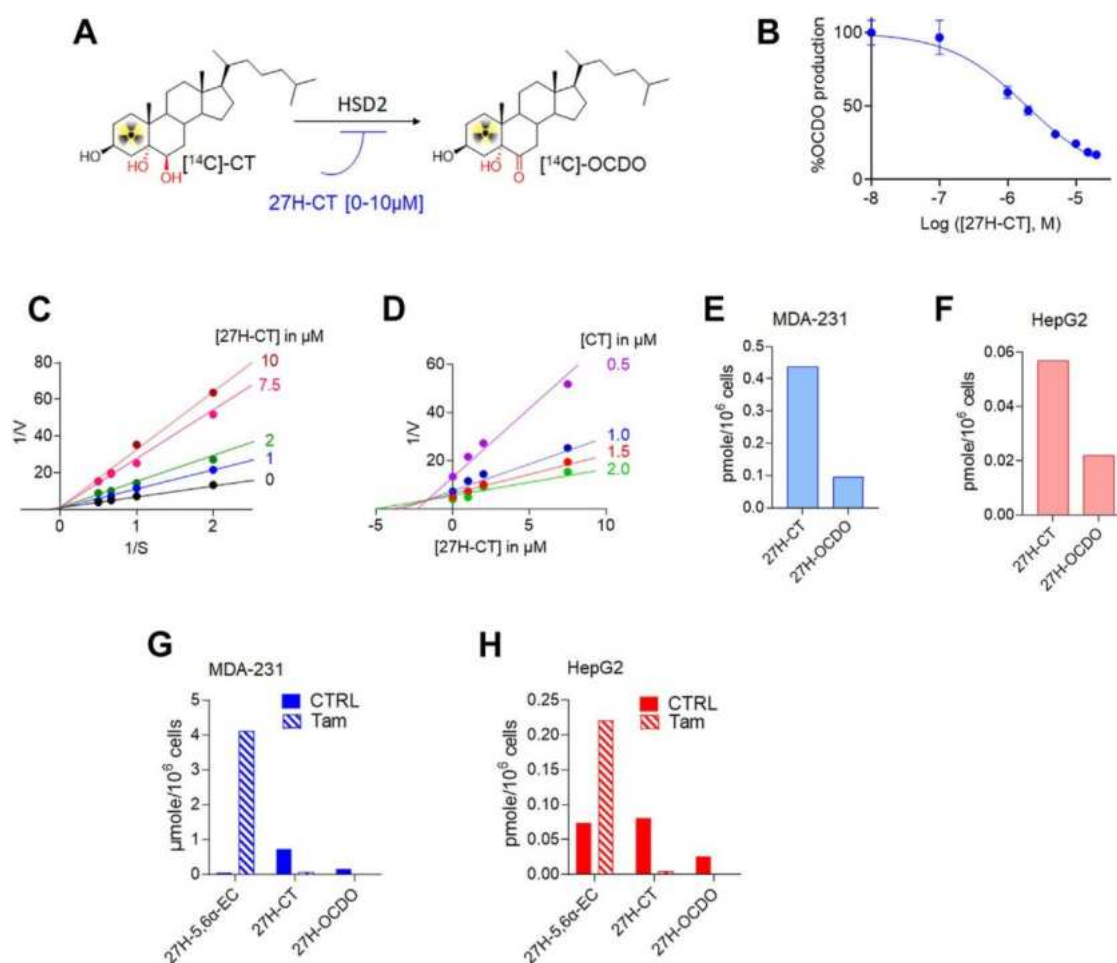


Fig. 6. A: Scheme describing the inhibition of the OCDO synthase activity of HSD2. The OCDO synthase activity was assayed by measuring the conversion of  $[^{14}\text{C}]\text{-CT}$  to  $[^{14}\text{C}]\text{-OCDO}$  alone or with increasing concentrations of 27H-CT ranging from 0.1 to 20  $\mu\text{M}$ . Analyses were performed by thin-layer chromatography (TLC) and quantified as described in [Materials and Methods](#). B: Quantification of the dose-dependent inhibition of OCDO synthase activity measured by TLC with increasing concentrations of 27H-CT and expressed as the percentage of OCDO production relative to control. The modality of the inhibition of the OCDO synthase activity inhibition by 27H-CT was done using 0, 0.1, 1, 2, 5, 10, 15 and 20  $\mu\text{M}$  27H-CT with HEK293T-HSD2 cells lysate. C: Double reciprocal plots of 27OH-CT versus  $[^{14}\text{C}]\text{-CT}$ . D: Dixon representation of the inhibition by 27H-CT of the OCDO synthase activity. GC-MS quantification of 27H-CT and 27H-OCDO in the media of MDA-231 (E) and HepG2 cells (F) treated for 72 h with 1  $\mu\text{M}$  of 27H-CT. GC-MS quantification of 27H-5,6 $\alpha$ -EC, 27H-5,6 $\beta$ -EC, 27H-CT and 27H-OCDO in the media of MDA-231 (G) and HepG2 cells (H) treated for 72 h with 1  $\mu\text{M}$  of 27H-5,6-ECs (27H-5,6 $\alpha$ -EC (83%) and 27H-5,6 $\beta$ -EC (17%)) with or without 2.5  $\mu\text{M}$  tamoxifen (Tam).

knock-down abolished the biogenesis of 27H-OCDO, 27H-CT and 27H-5,6 $\alpha$ -EC on MDA-231-shCYP27A1 cells incubated with  $[^{14}\text{C}]\text{-OCDO}$  (Fig. 8B, C),  $[^{14}\text{C}]\text{-CT}$  (Fig. 8D, E) and  $[^{14}\text{C}]\text{-5,6}\alpha\text{-EC}$  with or without tamoxifen (Fig. 8F, G). Altogether, our data demonstrate that CYP27A1 catalyzes the 27-hydroxylation of 5,6-EC, CT, and OCDO in CYP27A1-expressing cells. These data established that the genetic invalidation of CYP27A1 blocked the 27-hydroxylation of OCDO and its precursors.

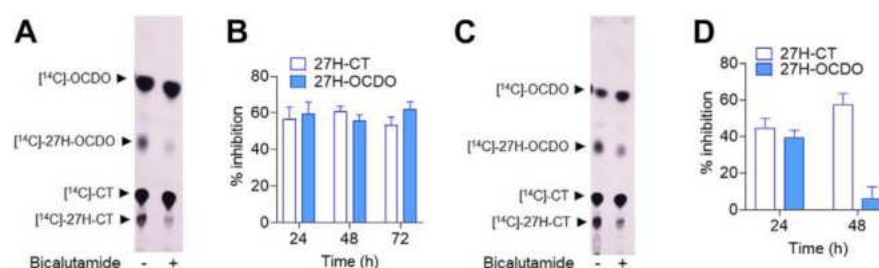


Fig. 7. Representative TLC autoradiograms (n = 5) of lipidic extracts from cell media of MDA-231 (A) and HepG2 cells (C) treated with 1  $\mu$ M [ $^{14}$ C]-CT with or without 10  $\mu$ M bicalutamide for 48 h. Quantitative analysis of the 27H-OCDO and 27H-CT extracted from cell media of MDA-231 (B) and HepG2 (D) and expressed at the percentage of inhibition relative to control. The region corresponding to 27H-OCDO and 27H-CT were recovered and counted using a  $\beta$ -counter. Results are the mean ( $\pm$ SEM) of five independent experiments.

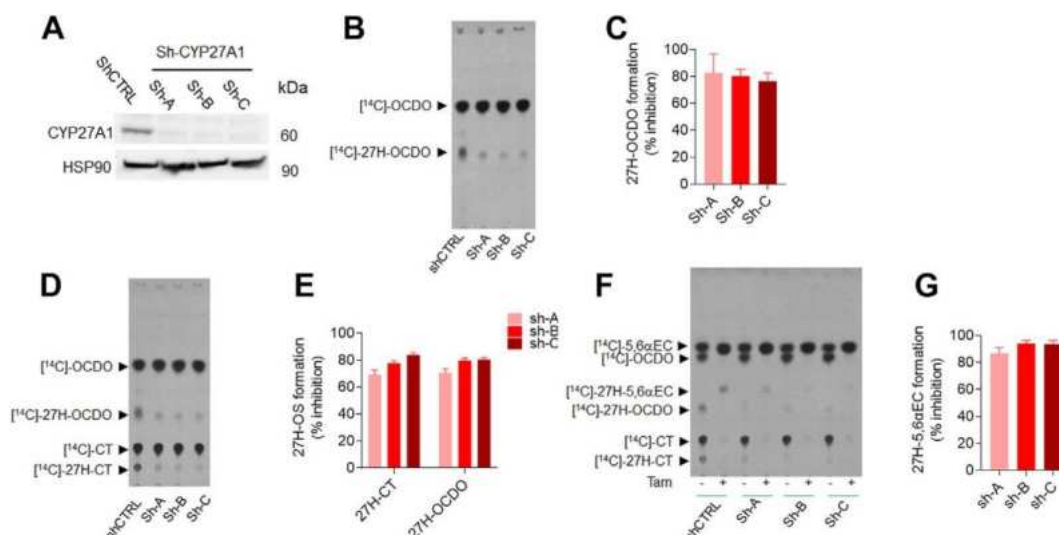


Fig. 8. Immunoblot analysis of CYP27A1 expression in shControl (shCTRL) and shCYP27A1-MDA-231 cells (shA, shB and shC). A: Representative TLC autoradiograms (n = 5) of lipidic extracts from cell media of shCTRL and shCYP27A1-MDA-231 cells (shA, shB and shC) treated with 1  $\mu$ M [ $^{14}$ C]-OCDO (B), [ $^{14}$ C]-CT (D) and [ $^{14}$ C]5,6 $\alpha$ -EC in the absence or presence of 2.5  $\mu$ M tamoxifen (F) for 48 h. Quantitative analysis of 27H-OCDO, 27H-CT and 27H-5,6 $\alpha$ -EC levels expressed as the percentage of inhibition relative to shCtrl-231. The region corresponding to these metabolites were recovered and counted using a  $\beta$ -counter. Results are the mean ( $\pm$ SEM) of five independent experiments (C, E, G).

Together, these data give pharmacological and genetic evidence that CYP27A1 catalyzes the 27-hydroxylation of OCDO and its precursor.

### Comparison of the impact of OCDO and 27H-OCDO on breast cancer cell proliferation

We next investigated the impact of 27H-OCDO on BC cell proliferation alone or in combination with OCDO or 27HC. As expected OCDO and 27HC stimulated MCF7 (ER $\alpha$ (+)) cell proliferation as reported (5, 22, 23) while 27H-OCDO inhibited their proliferation (Fig. 9A, C). In addition, 27H-OCDO significantly inhibited BC cells proliferation induced by OCDO or 27HC (Fig. 9A, C). Moreover, we found that OCDO, but not 27HC, stimulated the proliferation of MDA-231 (TN) cells (Fig. 9B). Similar to what was found on MCF7 (ER(+)) cells, 27H-OCDO blocked the effect of OCDO (Fig. 9B). We previously described that high levels of HSD2 (HSD11B2) mRNA were significantly associated with a poor prognosis (decreased recurrence free survival rate) in all patients with BC (Fig. 9D). Interestingly, a Kaplan-Meier analysis of high versus low expression of CYP27A1 increases the recurrence free survival in all BC (Fig. 9E) and this effect is also observed considering the combination HSD11B2/CYP27A1 (Fig. 9F). These effects are even more pronounced considering TN BC only (Fig. 9G–I). These data established that 27-hydroxylation of OCDO converts the tumor-promoting property of OCDO into a compound with antiproliferative properties. In addition, 27H-OCDO inhibits the proliferative activities of both 27HC and 27H-OCDO. These effects are consistent with the protective effect found when CYP27A1 and HSD2 are overexpressed in all patients with BC and TN BC.

## DISCUSSION

We report herein the chemical synthesis of 25- and 27H-5,6-EC, -CT, and -OCDO. Using these compounds as standards, we were able to show that 27H-5,6-EC, 27H-CT, and 27H-OCDO are produced in CYP27A1- expressing cells. Their identity was confirmed using chromatographic, pharmacological, and genetic approaches. [14C]-labeled-intermediates in the synthesis of OCDO gave compounds that co-migrates with the 25H- and 27H- standards in TLC in cells expressing CYP27A1 such as MDA-231, MDA-468, and HepG2 cells but not in MCF7 cells that do not express CYP27A1. Pulse done with unlabelled precursors and analyses by GC-MS-SIM of cell media extracts established that only 27H-5,6-ECs, 27H-CT, and 27-OCDO compounds were produced, ruling out the production of 25H-metabolites by these cells. We observed that these metabolites are mainly secreted in cell culture media and weakly or not detectable in cells showing that they are diffusible metabolites. 27H-5,6-ECs were detected only when ChEH activity was pharmacologically inhibited by drugs. Our data demonstrate for the first time that 27-hydroxylated 5,6-ECs, CT, and OCDO exist as human metabolites. We also elucidate the metabolic pathways involved in the biogenesis of these metabolites. Indeed, we showed that 27-hydroxylated 5,6-EC, CT, and OCDO are produced by direct 27-hydroxylation catalyzed by CYP27A1 (Figs. 8 and 10). In addition, 27H-OCDO is formed by

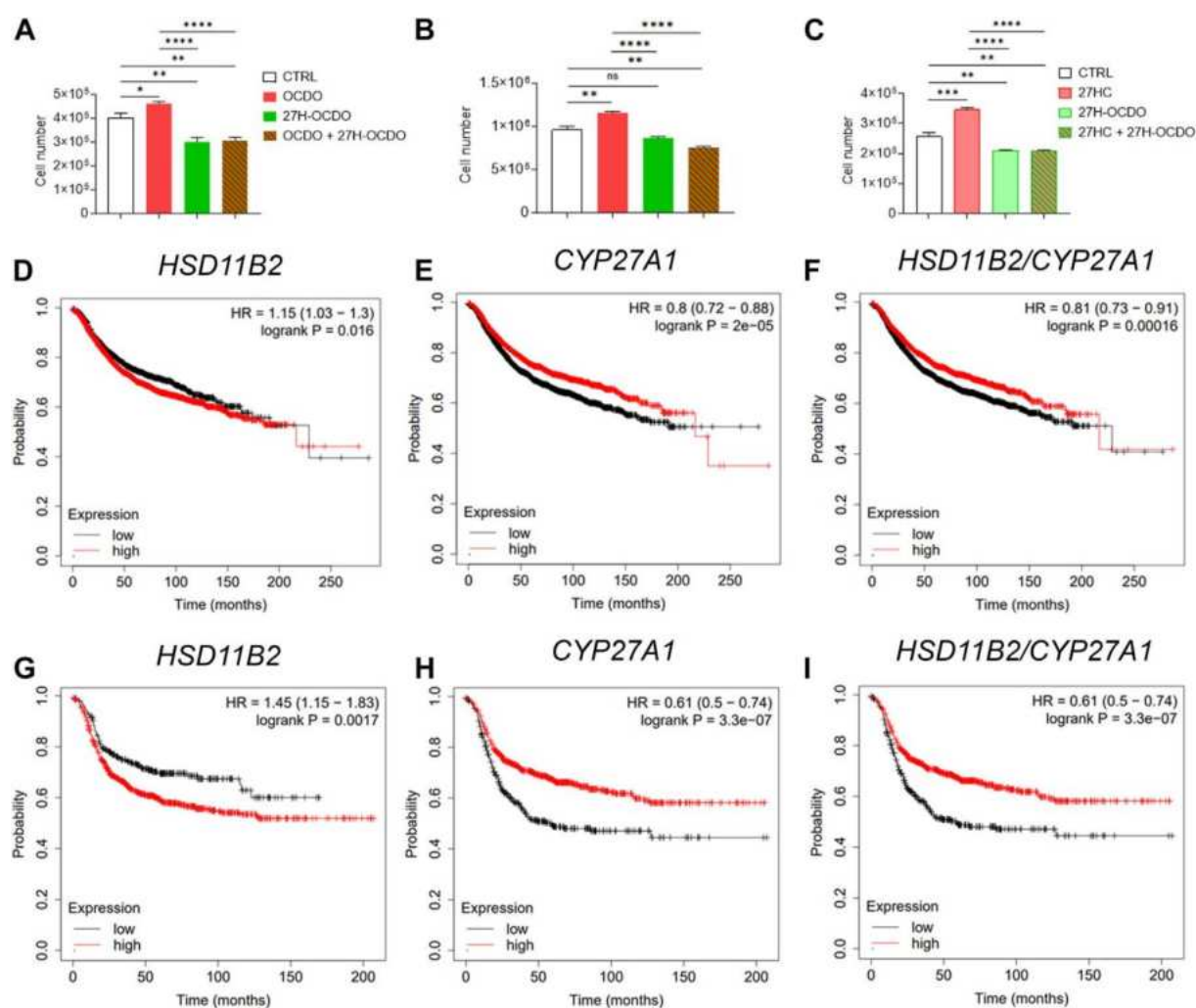


Fig. 9. MCF7 and MDA-231 cells were treated or not for 48 h with OCDO (1  $\mu$ M), 27HC (1  $\mu$ M) or 27OH-OCDO (1  $\mu$ M) alone or in combination. Cells were harvested by trypsinization and counted on a counting chamber Mallassez as described in [Materials and Methods](#). Cell number are expressed as the percentage relative to control (vehicle) (A-C). Kaplan-Meier

representation of patient recurrence free survival taking into account the expression (median cut-off) of the *HSD11B2* (D), *CYP27A1* (E) or *HSD11B2* and *CYP27A1* (F) genes using the Kmpot database on 50 individual datasets (4,934 samples) on all BC. Kaplan–Meier representation of ER-negative breast cancer patient recurrence free survival taking into account the expression (median cut-off) of the *HSD11B2* (G), *CYP27A1* (H) or *HSD11B2* and *CYP27A1* (I) genes using the Kmpot database on 50 individual datasets (1161 samples). Survival curves are based on Kaplan–Meier estimates and log-rank *P* values were calculated for differences in survival. Cox regression analysis was used to calculate hazard ratio (HR).

oxidation of 27H-CT driven by HSD2 whereas ChEH catalyzes the hydrolysis of 27H-5,6  and  -EC towards 27H-CT (Fig. 10). It is highly probable that 27HC undergoes epoxidation at the level of its delta-5,6 double bond to give 27H-5,6  and  -EC through lipoperoxidation or via cytochrome p450 as previously reported for cholesterol (35). Interestingly, we found that an elevated CYP27A1 expression in cells (MDA-468 and HepG2) leads to further metabolic transformations of 27H-5,6- EC, 27H-CT, and 27H-OCDO into more polar metabo- lites. Since we showed that the pharmacological and genetic inhibition of CYP27A1 inhibited their pro- duction, they are probably bile acid derivatives of 27H- compounds. Several studies showed that sterol and oxysterol metabolism in HepG2 cells led to lipid- soluble C24 and C27 bile acids as well as their water- soluble sulfate esters. It is thus highly probable that 27H-EC, 27H-CT and 27H-OCDO are converted into C24 and C27 bile acids (lipid soluble metabolites) and their sulfate ester (water-soluble metabolites) as observed for 7-ketocholesterol in HepG2 cells (39, 48, 51, 54). Thus, in HepG2 cells, we will obtain a complex mixture of polar compounds. The analysis of the phenotype of cell lines used in our study shows that while HepG2 cells expressed almost all the enzymes involved in bile acid biosynthesis (supplemental Table S2). Most of these enzymes are absent from the

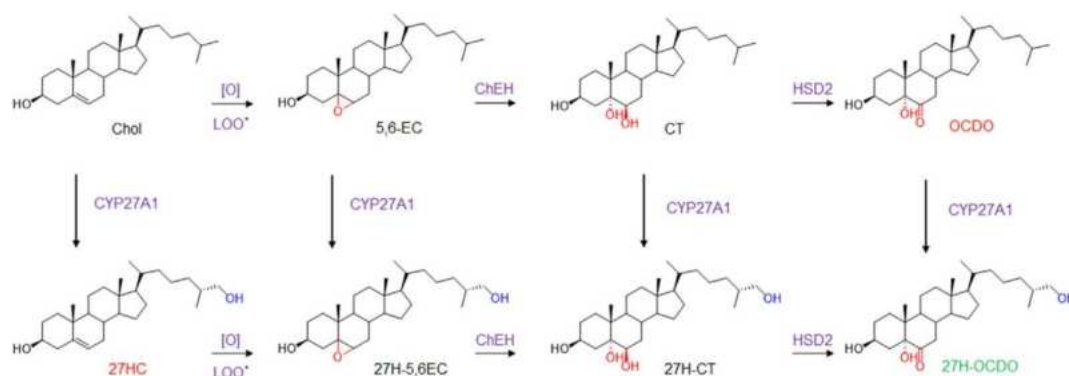


Fig. 10. Metabolic pathways showing the biogenesis of 27H-5,6-EC, 27H-CT and 27H-OCDO. [O] and LOO  represent respectively oxidative stress and lipid hydroperoxides radicals involved in the epoxidation of delta-5,6 double bond of cholesterol and 27HC. 27HC and OCDO are BC tumor promoters that induce proliferation (in red) whereas 27H-OCDO is antiproliferative and inhibits proliferative properties of 27HC and OCDO (in green).

BC cell lines (supplemental Table S2) except CYP27A1 which is well expressed in MDA-MB468 suggesting in this case that polar compounds that are observed on the bottom of the TLC autoradiogram of cell culture media extracts from MDA-468 (Fig. 3A, C) are likely to be C27 derivatives of OCDO and CT. This will deserve further investigations. We previously reported that OCDO is a tumor promoter on ER (+) and TN BC inducing cancer cell proliferation via the glucocorticoid receptor (5). In addition, it was shown that OCDO level as well as the expression of its biosynthetic enzymes (ChEH and HSD2) are increased in BC compared to normal adja- cent tissue and are positively associated with a poor prognostic (5). 27-HC was reported to stimulate the proliferation of ER (+) BC cells via ER, to induce an epithelial-mesenchymal transition and to promote an immunosuppressive tumor microenvironment through LXR favoring BC metastasis spreading (22, 23, 55). However, epidemiologic studies from the EPIC- Heidelberg cohort showed that higher circulating 27HC was associated with a lower risk of breast cancer in postmenopausal women (26, 56). Interestingly, we found that 27H-OCDO does not stimulate cell prolif- eration, but instead displays anti-proliferative properties in vitro and inhibits the stimulation of BC cell proliferation by OCDO and 27HC. Thus, 27H-OCDO level could better correlate with patient survival. The characterization of these new metabolites arising



from 27HC and from the 5,6-EC metabolic pathway offers new opportunities to get a better understanding of the relationship between oxysterols metabolism and BC development and will provide new standards and quantitative methods that will be available for epidemiological studies. Our data established that 27HC and OCDO are not end metabolic products and showed that these pathways can cross together to give mixed side-chain and B-ring oxysterols with antiproliferative properties. Our data suggest that directing BC cell metabolism toward 27H-OCDO could switch the pro-tumor activities of both 27HC and OCDO into potential endogenous anti-tumor compounds, opening up a new perspective in our understanding of BC occurrence and development. Since 27H-OCDO is the end-product in cells expressing low CYP27A1 levels but not in cells expressing high CYP27A1 levels, it will be of interest to determine the chemical structure and the biological properties of its bile acid derivatives. The accumulation of 27HC has been measured in the sera of patients suffering from Spastic paraplegia type 5 (SPG5), a genetic neurological disorder caused by recessive mutations in the gene CYP7B1 that is involved in 27HC catabolism (57). Whether 27H-5,6-EC, 27H-CT and 27H-OCDO also accumulate in SPG5 and their impact on neurodegeneration related to this genetic syndrome deserve to be studied. In addition, the relationship between CYP7B1 expression in BC and the level of these metabolites warrants investigation. 25H-metabolites were not detectable in the cell lines used in this study that do not (MCF7, MDA-468 and HepG2) or weakly (MDA-231) express CH25H. However, the transcriptomic database showed that some human BC cell lines (i.e., MDA-157: TPM = 2.8, MDA-436: TPM = 26.9, <https://www.proteinatlas.org/>) but also BC from patients, normal adjacent tissues and metastasis express CH25H (TNMplot). Consequently, the biogenesis of 25H-OCDO and its metabolic precursors probably occurs in CH25H-expressing cells. CH25H is notably highly expressed in immune cells including macrophages and leukocytes and its expression is increased by inflammation (58). It is noteworthy that CH25H have been reported for its key role in the control of inflammation and antitumor immune response. For example, in pancreatic cancer, the loss of CH25H expression is associated with the downregulation of MHC-I and decreased CD8+ T-cell tumor infiltration (59). In addition, the impairment of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) activity induced by trogocytosis between malignant cells and CTLs involve the downregulation of CH25H expression in various solid tumors (60). It was also reported that low expression of CH25H in leukocytes was significantly associated with lung adenocarcinoma metastasis (61). Consequently, whether 25H-OCDO is produced in BC and more particularly in tumor-infiltrated immune cells, its impact on BC cells proliferation and invasiveness as well as on antitumor immune response deserve to be investigated in the future. This study provides both chemical standards and quantitative GC-MS methods to quantify 25H-OCDO and its precursors in biological samples. In conclusion, this study identified new human cholesterol metabolites highlighting the importance of the 5,6-EC branch on the cholesterol pathway and in BC progression or control.

#### Data Availability

Data will be shared upon written request to Marc Poirot at CRCT through email ([marc.poirot@inserm.fr](mailto:marc.poirot@inserm.fr))   
*Supplemental data*

This article contains [supplemental data](#).


#### Acknowledgments

We thank Dr Lo c Van den Berghe from the Pole Technologique at CRCT for the amplification of plasmids, the production of virions and for his advice for transfection experiments. Structural analysis of compounds were done at the Service Commun de Resonance Magn tique Nucleaire- Plateforme scientifique et technique ICT FR 2599 UPS odile de Haute Technologie and at the ICT - UPS CNRS - Service Commun de Spectrom trie de Masse from the university of Toulouse III - Paul Sabatier, Toulouse, France. This work was funded by an internal grants from the "Institut National de la Sant  et de la Recherche M dicale", France; the "Universit  de Toulouse III, France; the Agence Nationale de la Recherche, France (DASYNT2, ANR-20-CE11-0005) and the Institut National du Cancer, France (PLBIO-2018-145, PLBIO-2020-028). This study has been partially supported through the grant EUR CARE N ANR-18-EURE-0003 in the framework of the Programme des Investissements d'Avenir.

#### Author contributions

M. P., S. S.-P., and P. D.-M. conceptualization; P. D.-M. methodology; P. D.-M., S.A., R. S., L. P., S. A., S. F. and D. L. investigation. P. D.-M., S. S. P. and M. P. and C. J. V. writing- original draft; P. D.-M., S. A., D. L., S. S.-P. and M. P. writing-eview and editing; M. P. and S. S.-P. funding acquisition; M. P., S. S.-P. and P. D.-M supervision.

#### Author ORCIDs

Dieter L  tjohann  <https://orcid.org/0000-0002-7941-8308> Sandrine Silvente-Poirot  <https://orcid.org/0000-0003-2245-9069> Marc Poirot  <https://orcid.org/0000-0002-5711-6624>

#### Funding and additional information

The Agence Nationale de la Recherche (DASYNT2, ANR-20-CE11-0005, EUR CARE N  ANR-18-EURE-0003). The Institut National du Cancer (PLBIO-2018-145, PL-BIO-2020- 028).

**Conflict of interest** The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Abbreviations

5,6-EC, 5,6-epoxycholestanol; OCDO, 6-oxo-cholestan-3  , 5  -diol, cholestan-6-oxo-3  ,5  -diol; DDA, dendrogenin A, 5  - hydroxy-6  -[2-(1H-imidazol-4-yl)-ethylamino]-cholestan-3  -ol; 27HC, 27-hydroxycholesterol, (25R)-cholest-5-ene-3  ,26-diol; 27H-5,6-EC, (25R)-5,6-epoxycholestan-3  ,26-diol; 27H-CT, (25R)-cholestane-3  ,5  ,6  ,26-tetrol; 27H-OCDO, (25R)-cholestane-6-oxo-3  ,5  ,26-triol; 25H-5,6-EC, 5,6-epoxycholestan- 3  ,25-diol; 25H-CT, cholestan-3  ,5  ,6  ,25-tetrol; 25H-OCDO, cholestan-6-oxo-3  ,5  ,25-triol; CT, cholestan-3  ,5  ,6  -triol; ChEH, cholesterol-5,6-epoxide hydrolase; CYP27A1, cyto- chrome P450 family 27 subfamily A member 1; ER(+) BC, estrogen receptor alpha positive breast cancer; HSD2, 11  - hydroxysteroid dehydrogenase type 2; TN BC, triple negative breast cancers; TPM, transcripts per kilobase million.

Manuscript received October 5, 2023, and in revised form November 8, 2023. Published, JLR Papers in Press, November 20, 2023, <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2023.100479>

#### REFERENCES

- Poirot, M. (2022) Sterol metabolism and cancer. *Biochem. Pharma- col.* 196, 114843
- Guillemot-Legris, O., and Muccioli, G. G. (2022) The oxysterome and its receptors as pharmacological targets in inflammatorydiseases. *Br. J. Pharmacol.* 179, 4917–4940
- de Medina, P., Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2022) Oxysterols are potential physiological regulators of ageing. *Ageing Res. Rev.* 77, 101615
- Poirot, M., Silvente-Poirot, S., and Team Cholesterol metabolism and therapeutic innovations (2019) Oxysterols: an expanding family of structurally diversified bioactive steroids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 194, 105443
- Voisin, M., de Medina, P., Mallinger, A., Dalenc, F., Huc-Claustre, E., Leignadier, J., et al. (2017) Identification of a tumor-promoter cholesterol metabolite in human breast cancers acting through the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E9346–E9355
- Wang, Y., Kumar, N., Solt, L. A., Richardson, T. I., Helver- ing, L. M., Crumbley, C., et al. (2010) Modulation of retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha and gamma activity by 7-oxygenated sterol ligands. *J. Biol. Chem.* 285, 5013–5025
- Umetani, M., Domoto, H., Gormley, A. K., Yuhanna, I. S., Cum- mins, C. L., Javitt, N. B., et al. (2007) 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen. *Nat. Med.* 13, 1185–1192
- Janowski, B. A., Grogan, M. J., Jones, S. A., Wisely, G. B., Kliewer, S. A., Corey, E. J., et al. (1999) Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 266–271
- Mazzacuva, F., Mills, P., Mills, K., Camuzeaux, S., Gissen, P., Nic- oli, E. R., et al. (2016) Identification of novel bile acids as bio- markers for the early diagnosis of Niemann-Pick C disease. *FEBS Lett.* 590, 1651–1662
- Raccosta, L., Fontana, R., Maggioni, D., Lanterna, C., Villablanca, E. J., Panicia, A., et al. (2013) The oxysterol-CXCR2 axis plays a key role in the recruitment of tumor-promoting neutrophils. *J. Exp. Med.* 210, 1711–1728
- Nachtergaele, S., Mydock, L. K., Krishnan, K., Rammohan, J., Schlesinger, P. H., Covey, D. F., et al. (2012) Oxysterols are allo- steric activators of the oncoprotein Smoothened. *Nat. Chem. Biol.* 8, 211–220
- Liu, C., Yang, X. V., Wu, J., Kuei, C., Mani, N. S., Zhang, L., et al. (2011) Oxysterols direct B-cell migration through EB12. *Nature.* 475, 519–523
- Hannedouche, S., Zhang, J., Yi, T., Shen, W., Nguyen, D., Pereira, J. P., et al. (2011) Oxysterols direct immune cell migration via EB12. *Nature.* 475, 524–527
- Rogers, M. A., Liu, J., Song, B. L., Li, B. L., Chang, C. C., and Chang, T. Y. (2015) Acyl-CoA:cholesterol acyltransferases (ACATs/SOATs): enzymes with multiple sterols as substrates and as activators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 151, 102–107
- de Medina, P., Paillasse, M. R., Segala, G., Poirot, M., and Silvente-

- Poirot, S. (2010) Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13520–13525
16. Schroepfer, G. J., Jr. (2000) Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* 80, 361–554
17. Arora, A., Taskinen, J. H., and Olkkonen, V. M. (2022) Coordination of inter-organelle communication and lipid fluxes by OSBP-related proteins. *Prog. Lipid Res.* 86, 101146
18. Reinmuth, L., Hsiao, C. C., Hamann, J., Rosenkilde, M., and Mackrill, J. (2021) Multiple targets for oxysterols in their regulation of the immune system. *Cells.* 10, 2078
19. Ben Hassen, C., Goupille, C., Vigor, C., Durand, T., Gueraud, F., Silvente-Poirot, S., et al. (2023) Is cholesterol a risk factor for breast cancer incidence and outcome? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 232, 106346
20. Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2014) Cancer. Cholesterol and cancer, in the balance. *Science.* 343, 1445–1446
21. Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2012) Cholesterol metabolism and cancer: the good, the bad and the ugly. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 673–676
22. Wu, Q., Ishikawa, T., Sirianni, R., Tang, H., McDonald, J. G., Yuhanna, I. S., et al. (2013) 27-Hydroxycholesterol promotes cell-autonomous, ER-positive breast cancer growth. *Cell Rep.* 5, 637–645
23. Nelson, E. R., Wardell, S. E., Jasper, J. S., Park, S., Suchindran, S., Howe, M. K., et al. (2013) 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science.* 342, 1094–1098
24. DeRouen, M. C., Yang, J., Li, Y., Franke, A. A., Tome, A. N., White, K. K., et al. (2023) Circulating 27-hydroxycholesterol, lipids, and steroid hormones in breast cancer risk: a nested case-control study of the Multiethnic Cohort Study. *Breast Cancer Res.* 25, 95
25. Le Cornet, C., Walter, B., Sookthai, D., Johnson, T. S., Kuhn, T., Herpel, E., et al. (2020) Circulating 27-hydroxycholesterol and breast cancer tissue expression of CYP27A1, CYP7B1, LXR-beta, and ERbeta: results from the EPIC-Heidelberg cohort. *Breast Cancer Res.* 22, 23
26. Lu, D. L., Le Cornet, C., Sookthai, D., Johnson, T. S., Kaaks, R., and Fortner, R. T. (2019) Circulating 27-hydroxycholesterol and breast cancer risk: results from the EPIC-heidelberg cohort. *J. Natl. Cancer Inst.* 111, 365–371
27. de Medina, P., Diallo, K., Huc-Claustre, E., Attia, M., Soules, R., Silvente-Poirot, S., et al. (2021) The 5,6-epoxycholesterol metabolic pathway in breast cancer: emergence of new pharmacological targets. *Br. J. Pharmacol.* 178, 3248–3260
28. Poirot, M., Soules, R., Mallinger, A., Dalenc, F., and Silvente-Poirot, S. (2018) Chemistry, biochemistry, metabolic fate and mechanism of action of 6-oxo-cholestan-3beta,5alpha-diol (OCDO), a tumor promoter and cholesterol metabolite. *Biochimie.* 153, 139–149
29. de Medina, P., Bunay, J., Poirot, M., Record, M., and Silvente-Poirot, S. (2023) Targeting NR1H/liver X receptor with dendrogin A differentiates tumor cells to activate a new secretory pathway releasing immunogenic anti-tumor vesicles enriched in LC3-II-associated exosomes. *Autophagy.* 19, 1036–1038
30. Record, M., Attia, M., Carayon, K., Pucheu, L., Bunay, J., Soules, R., et al. (2022) Targeting the liver X receptor with dendrogin A differentiates tumour cells to secrete immunogenic exosome-enriched vesicles. *J. Extracell. Vesicles.* 11, e12211
31. Soules, R., Audouard-Combe, F., Huc-Claustre, E., de Medina, P., Rives, A., Chatelut, E., et al. (2019) A fast UPLC-HILIC method for an accurate quantification of dendrogin A in human tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 194, 105447
32. Bauriaud-Mallet, M., Vija-Racaru, L., Brillouet, S., Mallinger, A., de Medina, P., Rives, A., et al. (2019) The cholesterol-derived metabolite dendrogin A functionally reprograms breast adenocarcinoma and undifferentiated thyroid cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 192, 105390
33. de Medina, P., Paillasse, M. R., Segala, G., Voisin, M., Mhamdi, L., Dalenc, F., et al. (2013) Dendrogin A arises from cholesterol and histamine metabolism and shows cell differentiation and anti-tumour properties. *Nat. Commun.* 4, 1840
34. de Medina, P., Paillasse, M. R., Payre, B., Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2009) Synthesis of new alkylaminooxysterols with potent cell differentiating activities: identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases. *J. Med. Chem.* 52, 7765–7777
35. Poirot, M., and Silvente-Poirot, S. (2013) Cholesterol-5,6-epoxides: chemistry, biochemistry, metabolic fate and cancer. *Biochimie.* 95, 622–631
36. de Medina, P., Ayadi, S., Diallo, K., Bunay, J., Pucheu, L., Brillouet, S., et al. (2024) The cholesterol-5,6-epoxide hydrolase: a metabolic checkpoint in several diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1440, 149–161
37. Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2012) Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 696–703
38. Silvente-Poirot, S., Dalenc, F., and Poirot, M. (2018) The effects of cholesterol-derived oncometabolites on nuclear receptor function in cancer. *Cancer Res.* 78, 4803–4808
39. Heo, G. Y., Bederman, I., Mast, N., Liao, W. L., Turko, I. V., and Pikuleva, I. A. (2011) Conversion of 7-ketocholesterol to oxysterol metabolites by recombinant CYP27A1 and retinal pigment epithelial cells. *J. Lipid Res.* 52, 1117–1127
40. Inasu, M., Bendahl, P. O., Ferno, M., Malmstrom, P., Borgquist, S., and Kimbung, S. (2021) High CYP27A1 expression is a biomarker of favorable prognosis in premenopausal patients with estrogen receptor positive primary breast cancer. *NPJ Breast Cancer.* 7, 127
41. Voisin, M., Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2014) One step synthesis of 6-oxo-cholestan-3beta,5alpha-diol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 782–785



42. Bartha, A., and Gyorffy, B. (2021) TNMplot.com: a web tool for the comparison of gene expression in normal, tumor and met- astatic tissues. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2622
43. Gyorffy, B. (2021) Survival analysis across the entire tran- scriptome identifies biomarkers with the highest prognostic power in breast cancer. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19, 4101–4109
44. Segala, G., de Medina, P., Iuliano, L., Zerbini, C., Paillasse, M. R., Noguer, E., et al. (2013) 5,6-Epoxy-cholesterols contribute to the anticancer pharmacology of tamoxifen in breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 86, 175–189
45. Lutjohann, D., Stellaard, F., Kerksiek, A., Lotsch, J., and Oertel, B. (2021) Serum 4beta-hydroxycholesterol increases during fluconazole treatment. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 77, 659–669
46. Mackay, D. S., Jones, P. J., Myrie, S. B., Plat, J., and Lutjohann, D. (2014) Methodological considerations for the harmonization of non-cholesterol sterol bio-analysis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 957, 116–122
47. Lyons, M. A., and Brown, A. J. (2001) Metabolism of an oxysterol, 7-ketocholesterol, by sterol 27-hydroxylase in HepG2 cells. *Lipids* 36, 701–711
48. Everson, G. T., and Polokoff, M. A. (1986) HepG2. A human hepatoblastoma cell line exhibiting defects in bile acid synthesis and conjugation. *J. Biol. Chem.* 261, 2197–2201
49. Cali, J. J., and Russell, D. W. (1991) Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reaction in bile acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 266, 7774–7778
50. Pikuleva, I., and Javitt, N. B. (2003) Novel sterols synthesized via the CYP27A1 metabolic pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 420, 35–39
51. Brown, A. J., Watts, G. F., Burnett, J. R., Dean, R. T., and Jessup, W. (2000) Sterol 27-hydroxylase acts on 7-ketocholesterol in human atherosclerotic lesions and macrophages in culture. *J. Biol. Chem.* 275, 27627–27633
52. Lam, M., Mast, N., and Pikuleva, I. A. (2018) Drugs and scaffold that inhibit cytochrome P450 27A1 in vitro and in vivo. *Mol. Pharmacol.* 93, 101–108
53. Mast, N., Lin, J. B., and Pikuleva, I. A. (2015) Marketed drugs can inhibit cytochrome P450 27A1, a potential new target for breast cancer adjuvant therapy. *Mol. Pharmacol.* 88, 428–436
54. Griffiths, W. J., Yutuc, E., Abdel-Khalik, J., Crick, P. J., Hearn, T., Dickson, A., et al. (2019) Metabolism of non-enzymatically derived oxysterols: clues from sterol metabolic disorders. *Free Radic. Biol. Med.* 144, 124–133
55. Baek, A. E., Yu, Y. A., He, S., Wardell, S. E., Chang, C. Y., Kwon, S., et al. (2017) The cholesterol metabolite 27 hydroxycholesterol facilitates breast cancer metastasis through its actions on im- mune cells. *Nat. Commun.* 8, 864
56. Decker, N. S., Johnson, T., Behrens, S., Obi, N., Kaaks, R., Chang- Claude, J., et al. (2023) Endogenous estrogen receptor modulating oxysterols and breast cancer prognosis: results from the MARIE patient cohort. *Br. J. Cancer.* 129, 492–502
57. Poir t, M. (2022) Sterol metabolism and cancer. *Biochem. Pharma- col.* 196, 114843
58. Guillemot-Legris, O., and Muccioli, G. G. (2022) The oxysterome and its receptors as pharmacological targets in inflammatory diseases. *Br. J. Pharmacol.* 179, 4917–4940
59. de Medina, P., Silvente-Poir t, S., and Poir t, M. (2022) Oxysterols are potential physiological regulators of ageing. *Ageing Res. Rev.* 77, 101615
60. Poir t, M., Silvente-Poir t, S., and Team Cholesterol metabolism and therapeutic innovations (2019) Oxysterols: an expanding family of structurally diversified bioactive steroids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 194, 105443
61. Voisin, M., de Medina, P., Mallinger, A., Dalenc, F., Huc-Claustre, E., Leignadier, J., et al. (2017) Identification of a tumor-promoter cholesterol metabolite in human breast cancers acting through the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E9346–E9355
62. Wang, Y., Kumar, N., Solt, L. A., Richardson, T. I., Helver- ing, L. M., Crumley, C., et al. (2010) Modulation of retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha and gamma activity by 7-oxygenated sterol ligands. *J. Biol. Chem.* 285, 5013–5025
63. Umetani, M., Domoto, H., Gormley, A. K., Yuhanna, I. S., Cum- mins, C. L., Javitt, N. B., et al. (2007) 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen. *Nat. Med.* 13, 1185–1192
64. Janowski, B. A., Grogan, M. J., Jones, S. A., Wisely, G. B., Kliewer, S. A., Corey, E. J., et al. (1999) Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRA and LXRbeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 266–271
65. Mazzacova, F., Mills, P., Mills, K., Camuzeaux, S., Gissen, P., Nic- oli, E. R., et al. (2016) Identification of novel bile acids as bio- markers for the early diagnosis of Niemann-Pick C disease. *FEBS Lett.* 590, 1651–1662
66. Raccosta, L., Fontana, R., Magoni, D., Lanterna, C., Villablanca, E. J., Paniccia, A., et al. (2013) The oxysterol-CXCR2 axis plays a key role in the recruitment of tumor-promoting neutrophils. *J. Exp. Med.* 210, 1711–1728
67. Nachtergaele, S., Mydock, L. K., Krishnan, K., Rammohan, J., Schlesinger, P. H., Covey, D. F., et al. (2012) Oxysterols are allo- steric activators of the oncoprotein Smoothened. *Nat. Chem. Biol.* 8, 211–220
68. Liu, C., Yang, X. V., Wu, J., Kuei, C., Mani, N. S., Zhang, L., et al. (2011) Oxysterols direct B-cell migration through EBI2. *Nature.* 475, 519–523
69. Hannedouche, S., Zhang, J., Yi, T., Shen, W., Nguyen, D., Pereira,

- J. P., et al. (2011) Oxysterols direct immune cell migration via EBI2. *Nature*. 475, 524–527
70. Rogers, M. A., Liu, J., Song, B. L., Li, B. L., Chang, C. C., and Chang, T. Y. (2015) Acyl-CoA:cholesterol acyltransferases (ACATs/SOATs): enzymes with multiple sterols as substrates and as activators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 151, 102–107
71. de Medina, P., Paillasse, M. R., Segala, G., Poirot, M., and Silvente-Poirot, S. (2010) Identification and pharmacological characterization of cholesterol-5,6-epoxide hydrolase as a target for tamoxifen and AEBS ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13520–13525
72. Schroepfer, G. J., Jr. (2000) Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* 80, 361–554
73. Arora, A., Taskinen, J. H., and Olkkonen, V. M. (2022) Coordination of inter-organelle communication and lipid fluxes by OSBP-related proteins. *Prog. Lipid Res.* 86, 101146
74. Reinmuth, L., Hsiao, C. C., Hamann, J., Rosenkilde, M., and Mackrill, J. (2021) Multiple targets for oxysterols in their regulation of the immune system. *Cells*. 10, 2078
75. Ben Hassen, C., Goupille, C., Vigor, C., Durand, T., Gueraud, F., Silvente-Poirot, S., et al. (2023) Is cholesterol a risk factor for breast cancer incidence and outcome? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 232, 106346
76. Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2014) Cancer. Cholesterol and cancer, in the balance. *Science*. 343, 1445–1446
77. Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2012) Cholesterol metabolism and cancer: the good, the bad and the ugly. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 673–676
78. Wu, Q., Ishikawa, T., Sirianni, R., Tang, H., McDonald, J. G., Yuhanna, I. S., et al. (2013) 27-Hydroxycholesterol promotes cell-autonomous, ER-positive breast cancer growth. *Cell Rep.* 5, 637–645
79. Nelson, E. R., Wardell, S. E., Jasper, J. S., Park, S., Suchindran, S., Howe, M. K., et al. (2013) 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology. *Science*. 342, 1094–1098
80. DeRouen, M. C., Yang, J., Li, Y., Franke, A. A., Tome, A. N., White, K. K., et al. (2023) Circulating 27-hydroxycholesterol, lipids, and steroid hormones in breast cancer risk: a nested case-control study of the Multiethnic Cohort Study. *Breast Cancer Res.* 25, 95
81. Le Cornet, C., Walter, B., Sookthai, D., Johnson, T. S., Kuhn, T., Herpel, E., et al. (2020) Circulating 27-hydroxycholesterol and breast cancer tissue expression of CYP27A1, CYP7B1, LXR-beta, and ERbeta: results from the EPIC-Heidelberg cohort. *Breast Cancer Res.* 22, 23
82. Lu, D. L., Le Cornet, C., Sookthai, D., Johnson, T. S., Kaaks, R., and Fortner, R. T. (2019) Circulating 27-hydroxycholesterol and breast cancer risk: results from the EPIC-heidelberg cohort. *J. Natl. Cancer Inst.* 111, 365–371
83. de Medina, P., Diallo, K., Huc-Claustre, E., Attia, M., Soules, R., Silvente-Poirot, S., et al. (2021) The 5,6-epoxycholesterol metabolic pathway in breast cancer: emergence of new pharmacological targets. *Br. J. Pharmacol.* 178, 3248–3260
84. Poirot, M., Soules, R., Mallinger, A., Dalenc, F., and Silvente-Poirot, S. (2018) Chemistry, biochemistry, metabolic fate and mechanism of action of 6-oxo-cholestan-3beta,5alpha-diol (OCDO), a tumor promoter and cholesterol metabolite. *Biochimie*. 153, 139–149
85. de Medina, P., Bunay, J., Poirot, M., Record, M., and Silvente-Poirot, S. (2023) Targeting NR1H/liver X receptor with dendrogin A differentiates tumor cells to activate a new secretory pathway releasing immunogenic anti-tumor vesicles enriched in LC3-II-associated exosomes. *Autophagy*. 19, 1036–1038
86. Record, M., Attia, M., Carayon, K., Pucheu, L., Bunay, J., Soules, R., et al. (2022) Targeting the liver X receptor with dendrogin A differentiates tumour cells to secrete immunogenic exosome-enriched vesicles. *J. Extracell. Vesicles*. 11, e12211
87. Soules, R., Audouard-Combe, F., Huc-Claustre, E., de Medina, P., Rives, A., Chatelut, E., et al. (2019) A fast UPLC-HILIC method for an accurate quantification of dendrogin A in human tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 194, 105447
88. Bauriaud-Mallet, M., Vija-Racaru, L., Brillouet, S., Mallinger, A., de Medina, P., Rives, A., et al. (2019) The cholesterol-derived metabolite dendrogin A functionally reprograms breast adenocarcinoma and undifferentiated thyroid cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 192, 105390
89. de Medina, P., Paillasse, M. R., Segala, G., Voisin, M., Mhamdi, L., Dalenc, F., et al. (2013) Dendrogin A arises from cholesterol and histamine metabolism and shows cell differentiation and anti-tumour properties. *Nat. Commun.* 4, 1840
90. de Medina, P., Paillasse, M. R., Payre, B., Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2009) Synthesis of new alkylaminooxysterols with potent cell differentiating activities: identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases. *J. Med. Chem.* 52, 7765–7777
91. Poirot, M., and Silvente-Poirot, S. (2013) Cholesterol-5,6-epoxides: chemistry, biochemistry, metabolic fate and cancer. *Biochimie*. 95, 622–631
92. de Medina, P., Ayadi, S., Diallo, K., Bunay, J., Pucheu, L., Brillouet, S., et al. (2024) The cholesterol-5,6-epoxide hydrolase: a metabolic checkpoint in several diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1440, 149–161
93. Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2012) Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 696–703
94. Silvente-Poirot, S., Dalenc, F., and Poirot, M. (2018) The effects of cholesterol-derived oncometabolites on nuclear receptor function in cancer. *Cancer Res.* 78, 4803–4808
95. Heo, G. Y., Bederman, I., Mast, N., Liao, W. L., Turko, I. V., and Pikuleva, I. A. (2011) Conversion of 7-ketocholesterol to oxysterol metabolites by recombinant CYP27A1 and retinal pigment epithelial cells. *J. Lipid Res.* 52, 1117–1127
96. Inasu, M., Bendahl, P. O., Ferno, M., Malmstrom, P., Borgquist, S.,

- and Kimbung, S. (2021) High CYP27A1 expression is a biomarker of favorable prognosis in premenopausal patients with estrogen receptor positive primary breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 7, 127
97. Voisin, M., Silvente-Poirot, S., and Poirot, M. (2014) One step synthesis of 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 782–785
98. Bartha, A., and Gyorffy, B. (2021) TNMplot.com: a web tool for the comparison of gene expression in normal, tumor and met-astatic tissues. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 2622
99. Gyorffy, B. (2021) Survival analysis across the entire transcriptome identifies biomarkers with the highest prognostic power in breast cancer. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19, 4101–4109
100. Segala, G., de Medina, P., Iuliano, L., Zerbinati, C., Paillasse, M. R., Noguer, E., et al. (2013) 5,6-Epoxy-cholesterols contribute to the anticancer pharmacology of tamoxifen in breast cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* 86, 175–189
101. Lutjohann, D., Stellaard, F., Kerkseik, A., Lotsch, J., and Oertel, B. G. (2021) Serum 4 $\beta$ -hydroxycholesterol increases during fluconazole treatment. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 77, 659–669
102. Mackay, D. S., Jones, P. J., Myrie, S. B., Plat, J., and Lutjohann, D. (2014) Methodological considerations for the harmonization of non-cholesterol sterol bio-analysis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 957, 116–122
103. Lyons, M. A., and Brown, A. J. (2001) Metabolism of an oxysterol, 7-ketocholesterol, by sterol 27-hydroxylase in HepG2 cells. *Lipids*. 36, 701–711
104. Everson, G. T., and Polokoff, M. A. (1986) HepG2. A human hepatoblastoma cell line exhibiting defects in bile acid synthesis and conjugation. *J. Biol. Chem.* 261, 2197–2201
105. Cali, J. J., and Russell, D. W. (1991) Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reaction in bile acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 266, 7774–7778
106. Pikuleva, I., and Javitt, N. B. (2003) Novel sterols synthesized via the CYP27A1 metabolic pathway. *Arch. Biochem. Biophys.* 420, 35–39
107. Brown, A. J., Watts, G. F., Burnett, J. R., Dean, R. T., and Jessup, W. (2000) Sterol 27-hydroxylase acts on 7-ketocholesterol in human atherosclerotic lesions and macrophages in culture. *J. Biol. Chem.* 275, 27627–27633
108. Lam, M., Mast, N., and Pikuleva, I. A. (2018) Drugs and scaffold that inhibit cytochrome P450 27A1 in vitro and in vivo. *Mol. Pharmacol.* 93, 101–108
109. Mast, N., Lin, J. B., and Pikuleva, I. A. (2015) Marketed drugs can inhibit cytochrome P450 27A1, a potential new target for breast cancer adjuvant therapy. *Mol. Pharmacol.* 88, 428–436
110. Griffiths, W. J., Yutuc, E., Abdel-Khalik, J., Crick, P. J., Hearn, T., Dickson, A., et al. (2019) Metabolism of non-enzymatically derived oxysterols: clues from sterol metabolic disorders. *Free Radic. Biol. Med.* 144, 124–133
111. Baek, A. E., Yu, Y. A., He, S., Wardell, S. E., Chang, C. Y., Kwon, S., et al. (2017) The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol facilitates breast cancer metastasis through its actions on immune cells. *Nat. Commun.* 8, 864
112. Decker, N. S., Johnson, T., Behrens, S., Obi, N., Kaaks, R., Chang-Claude, J., et al. (2023) Endogenous estrogen receptor modulating oxysterols and breast cancer prognosis: results from the MARIE patient cohort. *Br. J. Cancer*. 129, 492–502

## Résultats et discussions

Cette étude vise à évaluer la capacité de l'enzyme CYP27A1 à catalyser la 27-hydroxylation de l'OCDO et de ses précurseurs dans différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires, et à déterminer les effets potentiels de cette modification sur l'activité pro-tumorale de l'OCDO. À partir de la base de données, nous avons sélectionné les lignées cellulaires en fonction de l'expression rapportée du CYP27A1. Les lignées choisies, classées par niveau d'expression de l'enzyme, sont les suivantes : MCF7 (absence d'expression) < MDA-MB-231 < MDA-MB-468 < HepG2, les HepG2 étant utilisées comme contrôle positif en raison de leur rôle bien établi dans le métabolisme des stérols. Nos résultats montrent que les lignées exprimant le CYP27A1 ont la capacité de convertir l'OCDO et ses précurseurs en métabolites 27-hydroxylés. Plus précisément, l'OCDO est transformé en 27H-OCDO, le CT est converti en OCDO et en 27-CT ainsi qu'en 27H-OCDO, tandis que les 5,6-ECs sont fortement métabolisés en CT et en OCDO, avec la formation des formes hydroxylées 27H-CT et 27H-OCDO. L'ajout du Tamoxifène (Tam), un inhibiteur de la ChEH, bloque la conversion des 5,6-ECs en CT, entraînant ainsi une accumulation des 5,6-ECs et l'apparition de leurs formes hydroxylées en position C27, les 27H-5,6ECs. La nature et la position de l'hydroxylation en C27 ont été confirmées par CCM en co-migration avec des standards authentiques, ainsi que par GC-MS. L'implication du CYP27A1 dans cette hydroxylation en C27 a été validée par deux méthodes complémentaires : l'utilisation du Bicalutamide, un inhibiteur du CYP27A1, a révélé une réduction significative de la conversion du CT en 27H-CT et 27H-OCDO. Le knock-down du gène CYP27A1 entraîne également une inhibition de la formation des 27H-5,6ECs, 27H-CT et 27H-OCDO à partir de leurs précurseurs 5,6-ECs, CT et OCDO, respectivement.

Ces résultats indiquent que les formes 27-hydroxylées des 5,6-ECs, du CT et de l'OCDO sont directement produites par l'enzyme CYP27A1, révélant ainsi pour la première fois quatre nouveaux substrats de cette enzyme : le 5,6 $\alpha$ -EC, le 5,6 $\beta$ -EC, le CT et l'OCDO. Nous avons également évalué la possibilité d'une voie parallèle de formation, impliquant l'hydratation des 27H-5,6ECs en 27H-CT par la ChEH, suivie de l'oxydation du 27H-CT en 27H-OCDO par la 11 $\beta$ -HSD2. Les tests enzymatiques réalisés sur des lysats cellulaires contenant l'enzyme 11 $\beta$ -HSD2 ont révélé une inhibition compétitive de la conversion du CT en OCDO par le 27H-CT, de manière dose-dépendante avec un IC<sub>50</sub> de 2,1  $\mu$ M. De plus, les analyses en GC-MS effectuées sur des cellules incubées avec le 27H-CT ont montré sa conversion en 27H-OCDO. Les résultats

en GC-MS ont également montré que le 27H-CT pouvait être généré à partir des 27H-5,6ECs en présence de la ChEH. Ces résultats révèlent pour la première fois que le 27H-CT est un substrat de la 11 $\beta$ -HSD2, et que la ChEH n'est pas exclusive à l'hydratation des 5,6-ECs mais également de leurs formes 27-hydroxylées, le 27H-5,6 $\alpha$ -EC et le 27H-5,6 $\beta$ -EC.

Par ailleurs, nous avons observé que dans des conditions d'expression modérée de CYP27A1, les cellules MDA-MB-231 ne produisent que des formes 27-hydroxylées des stérols. En revanche, à des niveaux plus élevés d'expression de l'enzyme, plusieurs produits plus polaires apparaissent, co-migrant avec des acides biliaires en CCM, et dont l'intensité augmente avec l'expression de l'enzyme, comme observé dans les cellules HepG2 et MDA-MB-468. Cette observation est cohérente avec le fait que le CYP27A1 régule une voie alternative de formation des acides biliaires (Ridlon et Gaskins 2024). Ces données suggèrent que l'expression intracellulaire de CYP27A1 influence non seulement la production de métabolites hydroxylés en position C27 des stérols, mais également celle des dérivés acides biliaires.

Nous avons ensuite évalué les effets du 27H-OCDO sur la prolifération des cellules du CS, en présence ou en l'absence de co-traitements avec l'OCDO ou le 27-HC. Tandis que l'OCDO et le 27-HC stimulent la prolifération des cellules cancéreuses, le 27H-OCDO inhibe significativement cette prolifération, tant dans des conditions basales que celles induites par l'OCDO ou le 27-HC.

### Conclusion et perspectives

Nous avons réalisé la synthèse et la caractérisation de divers standards, dont les 5,6-ECs, CT, OCDO et leurs dérivés hydroxylés en positions C27 et C25. Cette approche nous a permis de conclure que les formes hydroxylées 27H-5,6ECs, 27H-CT et 27H-OCDO sont produites par les lignées exprimant l'enzyme CYP27A1, révélant ainsi l'existence de nouveaux métabolites. La biogenèse de ces métabolites implique deux voies métaboliques parallèles : d'une part, le CYP27A1 catalyse directement la formation des métabolites hydroxylés à partir de leurs précurseurs (5,6-ECs, CT, OCDO); d'autre part, le 27H-OCDO peut être généré par l'oxydation du 27H-CT par la 11 $\beta$ -HSD2, tandis que la ChEH convertit les 27H-5,6ECs en 27H-CT. Cette étude met en lumière non seulement de nouveaux substrats de l'enzyme CYP27A1, mais également de la ChEH et de la 11 $\beta$ -HSD2.

Cette 27 hydroxylation au niveau de l'OCDO modifie ses propriétés biologiques, passant d'une activité proliférative à une action antiproliférative. Nos résultats montrent que le 27H-OCDO inhibe la prolifération des cellules ER $\alpha$ + et TN, tout en bloquant les effets mitogènes du 27-HC et de l'OCDO sur ces cellules *in vitro*. Il est désormais crucial de valider ces effets dans des modèles *in vivo*, notamment chez des souris porteuses de tumeurs du CS. Si ces propriétés antiprolifératives se confirment, le 27H-OCDO pourrait se révéler un agent anti-tumoral prometteur, justifiant ainsi la nécessité de quantifier sa concentration chez les patientes atteintes de CS. Il serait également pertinent de déterminer le mécanisme d'action du 27H-OCDO, notamment s'il agit en tant que compétiteur de l'OCDO sur le GR, s'il est un ligand et modulateur des récepteurs ER $\alpha$  comme que le 27-HC ou encore si c'est un modulateur des récepteurs LXRs. Ces interrogations s'étendent également aux formes 27-H des 5,6-ECs et du CT. Ces molécules pourront dorénavant servir de standards pour déterminer s'ils sont présents dans les tissus et les fluides biologiques (plasma sanguin). De plus, ces métabolites mettent en évidence l'importance de la branche des 5,6-ECs dans la voie du cholestérol dans la cancérogenèse.

## Article 3

### **La glutathion S-transférase A1-1 est l'enzyme responsable de la synthèse de la dendrogénine A.**

**(En cours de finalisation)**

Silia Ayadi<sup>#</sup>, Philippe de Medina<sup>#</sup>, Georges Ndikoum-Matip, Virginie Nahoum, Maud Voisin, Birgitta Sjödin, Hey-Young H Kim, Camille Franchet, Ben Allal, Magali Lacroix-Triki, Thomas Filleron, Julia Gilhode, Lionel Mourey, Ned A. Porter, Bengt Mannervik, Laurent Maveyraud, Sandrine Silvente-Poirot et Marc Poirot.

#### Introduction

La dendrogénine A (DDA) est un métabolite endogène du cholestérol, présent chez les mammifères, résultant de la conjugaison stéréo- et régio-sélective du 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -époxycholestanol (5,6 $\alpha$ -EC) avec l'histamine (Philippe De Medina et al. 2009; 2013). Il a été établi que la synthèse chimique et biologique de la DDA requiert un catalyseur ou une enzyme de nature protéique spécifique (Philippe De Medina et al. 2013). En effet, contrairement à la réactivité connue des composés contenant un cycle oxirane (époxyde) vis-à-vis des nucléophiles, le 5,6 $\alpha$ -EC est extrêmement stable et ne réagit pas spontanément avec des groupes fonctionnels nucléophiles tels que les amines (Paillasse et al. 2012). Bien que les conditions expérimentales pour sa production biochimique aient été établies, l'enzyme responsable de la biosynthèse de la DDA reste à identifier. La découverte de la DDA est d'une importance majeure en raison de ses propriétés anti-tumorales, ce qui n'avait jamais été observé pour un métabolite du cholestérol (Philippe De Medina et al. 2009; 2013). Elle constitue une nouvelle classe structurale de ligands endogènes de haute affinité pour les récepteurs LXRs, agissant principalement *via* le LXR $\beta$  pour le contrôle de la prolifération, de la redifférenciation, de la production de vésicules de sécrétion immuno-actives et de la mort par autophagie des cellules cancéreuses (Segala et al. 2017a). La DDA est un stéroïde contenant plusieurs atomes d'azote protonables, ce qui en fait le premier alcaloïde stéroïdien identifié chez les mammifères. L'identification de la DDA, la DDB et du C17 comme nouveaux métabolites du cholestérol établit l'existence d'une branche originale de lipides bioactifs au carrefour entre la voie du cholestérol et celles d'amines biogènes. L'existence de cette nouvelle classe de stéroïdes chez les mammifères démontre l'importance biologique des 5,6-ECs, initialement considérés comme des composés endogènes cancérigènes (Silvente-Poirot et al. 2016). La DDA exerce



une partie de ses effets anti-tumoraux en inhibant l'enzyme la cholesteryl-5,6-époxyde hydrolase (ChEH) (Philippe De Medina et al. 2013). La ChEH est responsable de l'hydratation des 5,6-ECs en cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT) (Philippe De Medina et al. 2010a), précurseur de l'oncométabolite 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol (OCDO), un promoteur tumoral formé par l'oxydation du CT *via* l'enzyme 11 $\beta$ -hydroxystéroïde-déshydrogénase de type II (11 $\beta$ -HSD2) (Voisin et al. 2017). Il serait pertinent d'évaluer si l'OCDO peut également inhiber l'enzyme qui est responsable de la biosynthèse de la DDA, étant donné que les enzymes impliquées dans la synthèse de l'OCDO (ChEH, 11 $\beta$ -HSD2) ainsi que les concentrations d'OCDO observées dans les contextes tumoraux du cancer du sein (CS) sont élevées (Voisin et al. 2017). En revanche, la DDA n'a pas été détectée dans les lignées cellulaires de CS et ses niveaux sont diminués chez les patientes atteintes de CS alors qu'elle est retrouvée dans les cellules normales et tissus sains (Philippe De Medina et al. 2013). Ces données mettent en évidence une dérégulation du métabolisme de la DDA, favorisant la production de l'OCDO dans les cancers mammaires. Ces données indiquent également que l'idée d'une catalyse par proximité qui pourrait permettre la conjugaison du 5,6 $\alpha$ -EC à l'histamine est invalide car la ChEH n'est pas suffisante pour produire la DDA. Par conséquent, l'identification de la DDA synthase (DDAS) est essentielle pour comprendre cette dérégulation.

### Démarche

Bien qu'une réaction entre le 5,6 $\alpha$ -EC et l'histamine n'ait jamais été décrite dans la littérature, une réaction analogue a été rapportée dans la fin des années 1970. En effet, il a été démontré que la glutathion S-transférase de rat (rGSTA1) catalyse la conjugaison du 5,6 $\alpha$ -EC avec le groupe thiol du tripeptide glutathion (GSH), produisant le 6 $\beta$ -S-glutathionyl-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol (DDC) comme produit unique. Ce produit présente des caractéristiques intéressantes similaires à celles attendues pour la production enzymatique de la DDA : il résulte d'une réaction de substitution nucléophile de type 2 (S<sub>N</sub>2) qui est régiosélective au niveau du carbone C6 du cycle époxyde. La réaction est également stéréosélective, l'attaque du nucléophile se produisant sur la face  $\beta$  de l'époxyde, ce qui conduit à une ouverture *trans*-diaxiale de celui-ci. Le produit final est donc un dérivé 6 $\beta$ -substitué avec la stéréochimie attendue de la DDA aux positions C5-C6, soit (5R,6R). De plus, cette réaction est diastéréosélective pour le 5,6 $\alpha$ -EC. Par conséquent, il est envisageable que l'homologue humain de la rGSTA1, la glutathionS-transférase A1 (hGSTA1), pourrait catalyser une réaction

similaire et que le remplacement du GSH par l'histamine comme substrat nucléophile puisse permettre la formation de la DDA. Nous avons émis donc l'hypothèse que la hGSTA1 était un candidat potentiel impliqué l'activité de la DDAS.

Nous avons d'abord synthétisé le précurseur radiomarké 5,6 $\alpha$ -EC pour permettre le suivi des réactions enzymatiques à l'aide de techniques de détection radioactive, ainsi que des standards non marqués tels que 5,6 $\alpha$ -EC, DDA et DDC, qui servent de référence pour identifier les produits obtenus. En collaboration avec l'équipe du Professeur Laurent Maveyraud de l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, la protéine recombinante hGSTA1 a été produite chez *E. coli* et nous l'avons purifié à homogénéité par chromatographie d'affinité. Nous avons validé la fonctionnalité de l'enzyme recombinante en testant sa capacité à catalyser la conjugaison du GSH avec le substrat de référence, le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB). Ces préparations ont servi à évaluer la capacité de l'enzyme à produire la DDA. Pour cette étude, nous avons sélectionné les lignées cellulaires suivantes :

- ⇒ HepG2 : Lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain qui exprime la hGSTA1 en ARNm (nTPM=97.3, donnée HPA), comme modèle cellulaire
- ⇒ HEK293T (Human Embryonic Kidney) 293T : Une lignée cellulaire immortalisée dérivée de cellules de rein embryonnaire humain, qui se caractérise par une haute capacité d'expression. Ces cellules ont été transfectées avec un plasmide codant pour la hGSTA1

Nous avons sélectionné les cellules HEK293T pour évaluer leur capacité à produire la DDA lorsque la hGSTA1 est surexprimée dans ces cellules. La lignée HepG2 qui exprime la hGSTA1 de façon constitutive sera testée pour sa capacité à produire la DDA et dans le cas positif nous déterminerons si l'inactivation génique sur l'expression de la hGSTA1 ou son inhibition pharmacologique entraîne une perte de production de la DDA. La production de la DDA a été suivie par chromatographie sur couche mince (CCM ; TLC), permettant de séparer la DDA de ses précurseurs, et validée par spectrométrie de masse (MS), en comparant les profils de fragmentation et les pics moléculaires avec ceux du standard DDA. Nous avons étudié le profil pharmacologique de la hGSTA1 dans son activité DDA synthase (DDAS) en utilisant des ligands connus de la hGSTA1 ainsi qu'une série d'oxystérols de type ROX (ring oxysterols) et SCOX (side chain oxysterols). Nous avons ensuite étudié l'activité DDAS de la hGSTA1 au niveau atomistique en tentant de déterminer la structure cristalline de la protéine en complexe avec

ses substrats et produits. Afin d'augmenter nos chances de succès, compte tenu de la faible hydrosolubilité des oxystérols, nous avons synthétisé des dérivés d'acides biliaires du 5,6 $\alpha$ -EC et de la DDA dont l'hydrosolubilité est significativement augmentée. Cette approche a permis à nos collaborateurs de réaliser des tests de cristallisation avec l'enzyme recombinante purifiée. Dans cette étude, nous avons également analysé des tissus tumoraux provenant de patientes atteintes de cancer du sein (CS) pour évaluer les niveaux d'expression de la hGSTA1 par immunohistochimie et son éventuelle corrélation avec les caractéristiques cliniques et pathologiques des tumeurs. De plus, le modèle murin MMTV-PyMT, un modèle transgénique qui développe spontanément des tumeurs dans les glandes mammaires nous a permis d'analyser le profil métabolique des 5,6-ECs au cours du développement tumoral, en observant les variations des niveaux de ses différents métabolites (CT, OCDO et DDA) et les niveaux de l'expression des enzymes impliquées dans leur génération. Ce modèle nous a également permis d'évaluer l'effet de l'administration de la DDA sur la progression tumorale et la formation de métastases pulmonaires.

## The tumor-suppressor cholesterol metabolite dendrogenin A is produced by glutathione S-transferase A1-1.

*Silia Ayadi<sup>a,b</sup>, Philippe de Medina <sup>a,b</sup>, Georges Ndikoum-Matip<sup>c</sup>, Magali Lacroix-Triki<sup>§</sup>, Virginie Nahoum<sup>c</sup>, Julio Noboa <sup>a,b</sup> Maud Voisin<sup>a</sup>, Laly Pucheux<sup>a,b</sup>, Birgitta Sjödin<sup>d</sup>, Emanuala Gadaleta<sup>e</sup>, Claude Chelala<sup>e</sup>, Hye-Young H Kim<sup>f</sup>, Camille Franchet<sup>g</sup>, Ben Allal<sup>g</sup>, , Lavinia Vija, Thomas Filleron<sup>g</sup>, Julia Gilhode<sup>g</sup>, Pauline le Faouder<sup>h</sup>, Justine Bertrand-Michel<sup>h</sup>, Lionel Mourey<sup>c</sup>, Ned A. Porter<sup>f</sup>, Bengt Mannervik<sup>e</sup>, Laurent Maveyraud<sup>d\*</sup>, Sandrine Silvente-Poirot<sup>a,b\*</sup> and Marc Poirot<sup>a,b\*</sup>.*

<sup>a</sup>Cancer Research Center of Toulouse, Team « Cholesterol Metabolism and Therapeutic Innovations», UMR 1037 Inserm, UMR 5071 CNRS, University of Toulouse 3, Toulouse, France.

<sup>b</sup>French network for Nutrition physical Activity and Cancer Research (NACRe network), Jouyen-Josas, France

<sup>c</sup>Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, UMR 5089 CNRS-Université de Toulouse 3, Toulouse, France.

<sup>d</sup>University of Stockholm, Stockholm, Sweden

<sup>e</sup>Barts Cancer Institute, Queen Mary University of London, UK

<sup>f</sup>Vanderbilt University, Nashville TN, USA

<sup>g</sup>Institut Claudius Regaud-Oncopole, Toulouse, France.

<sup>h</sup>MetaToulLipidomics Facility, INSERM UMR1048, Toulouse, France

<sup>§</sup> present address : Service de pathologie, Gustave-Roussy Cancer Campus, Villejuif, France.

### Contact:

[marc.poirot@inserm.fr](mailto:marc.poirot@inserm.fr), [laurent.maveyraud@ipbs.fr](mailto:laurent.maveyraud@ipbs.fr), [sandrine.poirot@inserm.fr](mailto:sandrine.poirot@inserm.fr).

**Additional footnotes:** <sup>§</sup>M.P. and S.S.P. contributed equally to this work.

**Keywords:** cholesterol-5,6-epoxide, histamine, dendrogenin A, tumor suppressor, glutathione S-transferase A1, cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol-6-one, breast cancer.

## Abstract

Dendrogenin A (DDA) is a natural cholesterol metabolite with significant tumor-suppressing and chemopreventive properties. It is formed through the stereospecific conjugation of 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxycholestanol and the primary amine of HA, catalyzed by an enzyme that was previously unidentified. This study identifies human glutathione S-transferase A1-1 (hGSTA1) as the enzyme responsible for DDA biosynthesis, referred to as DDA synthase (DDAS). In the breast, hGSTA1 is predominantly expressed in lactating mammary epithelial cells, the site of origin for about 70% of breast cancer cases. A decrease in hGSTA1 expression correlates with a reduction in DDA levels, linking the dysregulation of this enzyme to disruptions in DDA metabolism. This metabolic deregulation is further observed in a transgenic mouse model of breast cancer, where the administration of DDA notably inhibits tumor growth and metastasis to the lungs. The findings underscore the critical role of DDA metabolism, regulated by hGSTA1, in controlling breast cancer progression.

## Introduction

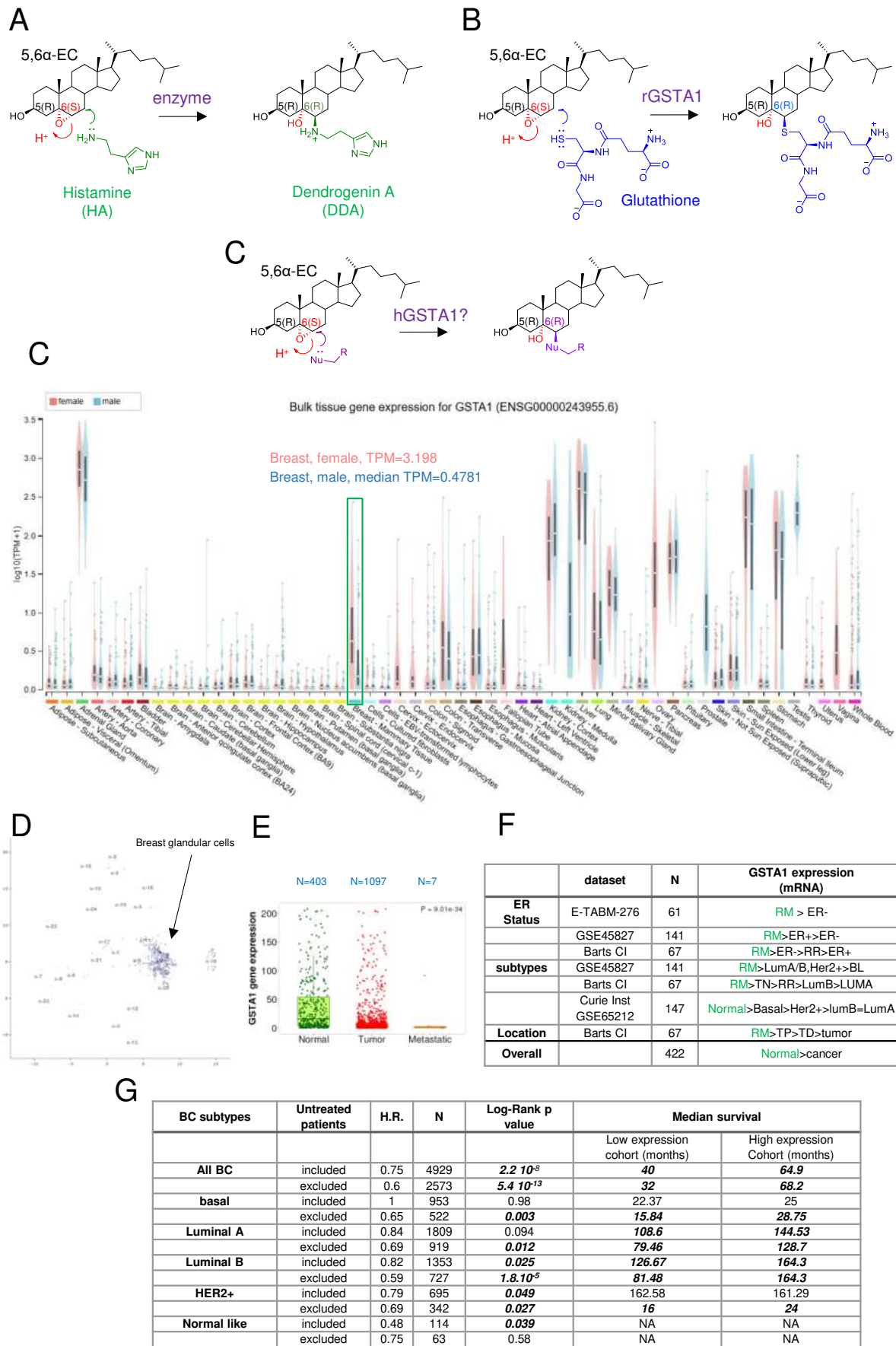
Metabolic studies have recently identified cholesterol derivatives with active properties in controlling tumor growth, shedding light at the molecular level on the complex and controversial contribution of cholesterol to the occurrence and development of breast cancers (BC) (1-3). In particular, a new branch of the cholesterol pathway, centered on the chemical modification of 5,6-epoxycholestanols (5,6-ECs), has been identified as being linked to BC (4-6). 5,6-ECs are B-ring oxysterols that exist as two diastereoisomers: 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxycholestanol (5,6 $\alpha$ -EC) and 5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxycholestanol (5,6 $\beta$ -EC). 5,6-ECs can be produced by oxidative stress, lipoperoxidation or/and enzymatically (7, 8). 5,6-ECs isomers have been found to be differentially metabolized to give bioactive products with opposite carcinogenic properties. (6, 8). On the one hand, 5,6-ECs are metabolized in breast tumors to oncosterone (OCDO), an oxysterol oncometabolite with tumor-promoting properties (2, 6, 9). On the other hand, 5,6 $\alpha$ -EC (but not 5,6 $\beta$ -EC) has been shown to be enzymatically conjugated with histamine (HA) to form dendrogenin A (DDA) (10). DDA is a bioactive lipid with tumor suppressive properties. (1, 6, 10-17). DDA exhibits *in vivo* chemopreventive and anticancer properties (9, 10, 12, 16) and sensitizes cancer cells to chemotherapeutic regimens (18, 19). At the cellular level, DDA activates cancer cell differentiation and death through an original biased agonist activity on liver-X-receptor  $\beta$  (LXR $\beta$ ) (2, 13, 15, 16, 19-21). In addition, DDA was found to block OCDO biosynthesis at the cholesterol-5,6-epoxide hydrolase (ChEH) step (9, 10). Previous studies have shown that OCDO, but not DDA, is present in breast cancer cell lines (9, 10). In addition, analysis of paired BC samples from 10 patients and non-tumor adjacent tissues showed a statistically significant decrease in DDA levels in BC, suggesting a deregulation of DDA metabolism associated with BC (10). Taken together, these findings highlight the contribution of this novel 5,6-ECs metabolic branch to breast carcinogenesis (3, 6, 9). Since the presence of OCDO in BC was due to the ectopic expression of its biosynthetic enzyme (9), the absence or decrease of DDA levels observed in BC could be due to the downregulation of its yet uncharacterized biosynthetic enzyme. Identification and characterization of the DDAS will be critical to the testing of this hypothesis.

DDA is formed in mammalian tissues by a stereoselective enzymatic conjugation of 5,6 $\alpha$ -EC with the  $\alpha$ -nitrogen of the primary amine of HA to give 5 $\alpha$ -hydroxy-6 $\beta$ -(2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino)cholestan-3 $\beta$ -ol (DDA) via a *trans*-diaxial epoxide ring opening (Fig. 1A) by an  $S_N2$  mechanism (10). This conjugation reaction between an electrophile (5,6 $\alpha$ -EC) and a nucleophile (the primary amine of HA) can also occur chemically with thiol-containing substances such as mercaptoethanol in the presence of a catalyst (22). Interestingly, rat glutathione S-transferase A1 (rGSTA1) was found to catalyze such a reaction between 5,6 $\alpha$ -EC and glutathione (GSH) as a nucleophilic thiol-bearing molecule (23). The product of this reaction is the 5 $\alpha$ -dihydroxycholestan-6 $\beta$ -yl-S-glutathione (CDO-SG), which has the expected (5 $\alpha$ , 6 $\beta$  or 5R, 6R) stereochemistry of DDA at C5-C6 (23, 24) (Fig. 1B). This indicates that both reactions follow the same  $S_N2$  mechanism, suggesting that the substitution of GSH with HA as a nucleophilic substrate in GSTA1 could potentially produce DDA (Fig. 1C). GSTA1 is a member of the GST superfamily of detoxification enzymes known to facilitate the conjugation of GSH with lipophilic xenobiotics, such as 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), to form dinitrobenzene-S-glutathione (DNB-SG) (supplementary figure S1A) (25). While GSTAs are promiscuous for structurally different electrophilic substances, including steroids (26), and have shown a selectivity for GSH (26, 27), other nucleophilic substances, such as amines, have not been tested as alternative substrates.

Here we investigate whether human hGSTA1 could be the DDA synthase (DDAS), study its expression level in BC subtypes in relation to patient survival, demonstrate its DDAS

activity, define its pharmacological profiles, and crystallize the enzyme in the presence of DDA. We report the existence of a similar 5,6-ECs metabolic deregulation in PyMTTg mice, a genetically engineered mouse model of spontaneous BC that recapitulates human BC (28). We found a metabolic switch on the 5,6-ECs metabolic branch with a decrease in DDA levels and an increase in OCDO levels during mammary tumor development and show that DDA complementation decreases tumor growth and lung metastasis colony formation.





**Fig 1.** A) Dendrogenin A (DDA) results from the stereoselective conjugation of the primary amine of histamine (HA) with 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxy-cholestanol (5,6 $\alpha$ -EC) to give 5 $\alpha$ -hydroxy-6 $\beta$ -(2-(1H-imidazol-4-yl)ethylamino)cholestan-3 $\beta$ -ol. B) Rat GSTA1-1 (rGSTA1) catalyzes the stereoselective glutathionylation of 5,6 $\alpha$ -EC to give 5 $\alpha$ -dihydroxycholestan-6 $\beta$ -yl-S-glutathione (CDO-SG), which has the same (5R,6R) stereochemistry as DDA at C5-C6. C) We hypothesize that human GSTA1-1 (hGSTA1) could catalyze the stereospecific conjugation of 5,6 $\alpha$ -EC with a small molecular weight nucleophilic substance like HA. D) Expression of hGSTA1. A: Violin plots of bulk tissue gene expression of hGSTA1 (transcript per million; TPM) from the analysis of the transcriptomic database GTEx (GTEx Portal). E) Human Protein Atlas single cell analysis of hGSTA1 mRNA expression showing that hGSTA1 mRNA is mainly localized on human breast glandular epithelial cells. F) Comparison of hGSTA1 mRNA expression in breast invasive carcinoma, metastasis and normal tissue from non-cancerous patients using RNAseq from TNMplot. G) Comparison of hGSTA1 mRNA expression from multiple datasets RM: healthy breast from cosmetic reduction mammoplasty, RR: risk reducing mastectomy, peritumoral samples excised at proximal (TP<2 cm) and distal (TD, 5-10 cm) sites from primary tumor. H) Kaplan Mayer survival analysis of BC patients expressed as recurrence-free survival (RFS).

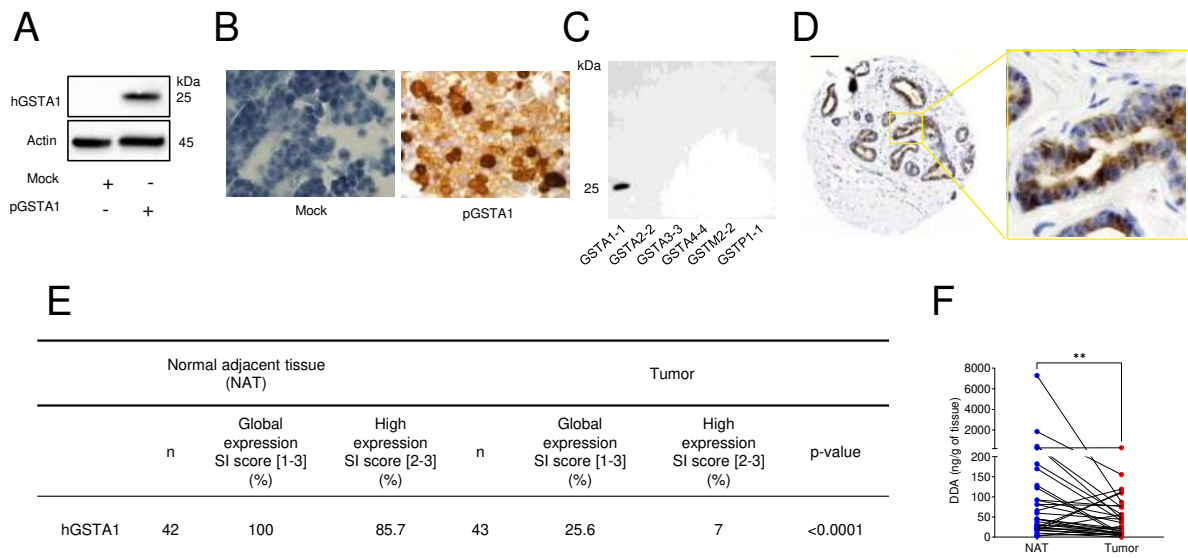
## Results

**hGSTA1 is expressed in the breast, is decreased in BC and its expression positively correlates with patient survival.** We have previously shown that DDA is present in normal breast (10), suggesting that its biosynthetic enzyme may be present in this tissue. The analysis of the transcriptomic database of GTEx (<https://www.gtexportal.org/>) shows that hGSTA1 is expressed in the breast (Fig. 1D, with 1.415 transcript per million, n=459). hGSTA2 and hGSTA3, which share more than 90% amino acid identity with hGSTA1 (Supplementary Fig S1B), are weakly expressed (respectively in female tissue TPM=0.09 and TPM=0.036). hGSTA1 is not significantly measurable detectable in male breast (Fig. 1C).

Single cell analysis in the human breast shows that hGSTA1 is mainly expressed at the mRNA level on mammary glandular epithelial cells (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000243955-GSTA1/single+cell+type/breast>) (Fig. 1E). These cells are epithelial cells that are responsible for the production of milk. Next, we compared hGSTA1 expression at the mRNA level in normal breast versus BC using TNMplot (29) and found a strong and significantly decreased expression of hGSTA1 (H.R. 0.78, p<0.0001, Mann\_Whitney) in BC tumors and BC metastases compared to normal breast tissue (normal: n=242; tumor n=7569; metastases:82) (Fig. 1F). This was confirmed by comparing hGSTA1 expression at the mRNA levels using breast tissues provided from resection mastectomy and compared with various mRNA datasets (Fig. 1G) (30).

This differential expression of hGSTA1 suggests that a parallel between the expression of hGSTA1 and the level of DDA we measured earlier could exist (10).

To determine whether hGSTA1 expression is associated with clinical pathogenesis, we analyzed publicly available BC transcriptomic datasets. Kaplan-Meier analysis of high versus low hGSTA1 mRNA expression from 35 microarray datasets available in KMplotter (31) showed that high hGSTA1 mRNA level in BC increased recurrence-free survival in all BC subtypes in 3951 patients treated with or without chemotherapy (hazard ratio = 0.75, p= 2.2 10<sup>-5</sup>, and hazard ratio = 0.6, p=5.4.10<sup>-13</sup>, respectively, Fig. 1H). Analysis of the PMA50 classified BC subtypes (32) indicates that hGSTA1 overexpression in luminal B, HER2+ and normal-like subtypes in patients treated with hormone therapy or chemotherapy and in untreated patients is associated with increased recurrence-free survival (Fig. 1H). Surprisingly, survival was more pronounced when excluding untreated patients in all BC, basal, luminal A and B and HER2+ BC, hGSTA1 high expression cohorts show an increase in median recurrence free survival in all groups except HER2+ (untreated cases included) and normal like BC (no data were available), the best impact being for luminal B subtype (Fig. 1H).



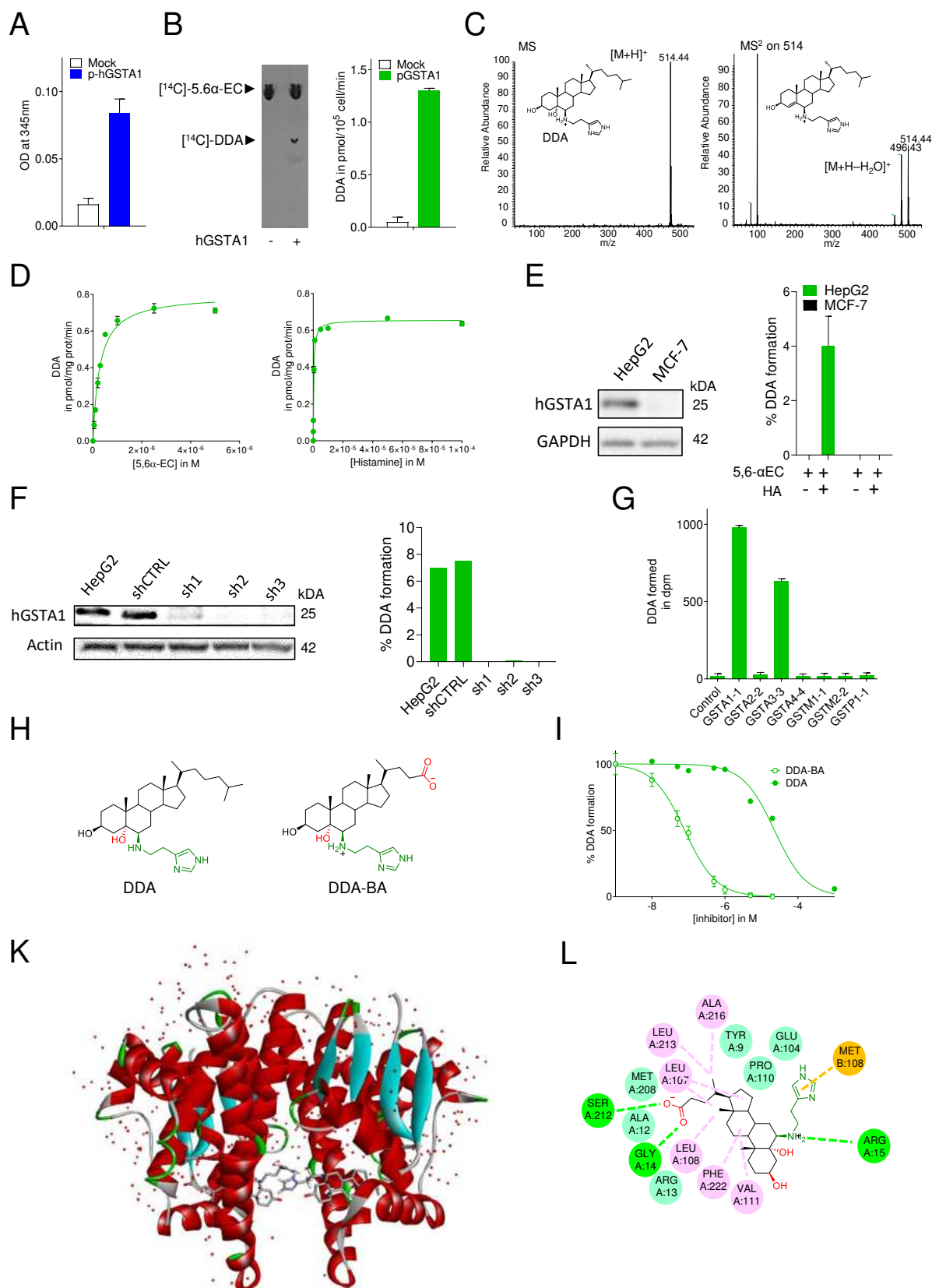
**Fig 2.** A) HEK293T cells were transfected with either a plasmid encoding hGSTA1 (pGSTA1) or the control empty plasmid (mock). The expression of hGSTA1 in HEK293T cells was confirmed by Immunoblot blot (n =3) and Immunocytochemistry (n =3) (B) using the anti hGSTA1: PA5-29811 from Thermo Scientific. C) Measure of the selectivity of the anti-hGSTA1 AB against hGSTA isoforms and other classes of hGST. 0.1µg protein were loaded on a SDS-PAGE and further analyzed by WB. D) Normal adjacent tissue (NAT) from BC patients biopsies were analyzed for hGSTA1 protein expression by IHC. E) IHC expression levels of hGSTA1 in patient samples. SI, staining intensity score. Enzyme expression in BC and NAT was analyzed using the McNemar test for paired samples. F) The indicated endogenous DDA levels were quantified by LC/MS in matched patient tumors and NAT (n=42). \*\*p<0.01, Wilcoxon test for paired samples, two-tailed.

hGSTA1 shares 95% amino acid identity with hGSTA2, 90% with hGSTA3 and 50% with hGSTA4 (Supplementary Fig. S1B). Anti-hGSTA antibodies used for IHC at the HPA show cross-reactivity between isoforms (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000243955-GSTA1/summary/antibody>). Therefore, we screened commercially available anti-hGSTA1 antibodies and found that Thermo Scientific PA5-29811 recognizes hGSTA1 well in WB and IHC and does not recognize other GST proteins. Our IHC analysis of hGSTA1-1 expression on ER+ BC biopsies confirms at the protein level, that hGSTA1 is selectively expressed in epithelial cells from lactating ducts (Fig.2E) and that its expression decreases in BC (Fig. 2F). A paired decrease in DDA levels was found between tumors and normal adjacent tissues (Fig 2H).

Taken together, these data show that hGSTA1 is selectively expressed in mammary gland epithelial cells and that its expression is decreased in BC. We further demonstrated that hGSTA1 is downregulated in BC and that high expression of hGSTA1 protects against tumor recurrence consistently with its putative activity of biosynthesis of the tumor suppressor metabolite DDA.

**hGSTA1 is a DDA-producing enzyme.** To determine whether hGSTA1-1 catalyzes the biosynthesis of DDA, hGSTA1 was transiently expressed in HEK-293 cells. Lysates of transfected HEK cells showed that hGSTA1-1 was active for CDNB glutathionylation (Fig. 3A). Cells expressing hGSTA1 were therefore incubated with [<sup>14</sup>C]5,6α-EC and HA, and we found that cells produced and secreted DDA (Fig. 3B). The DDAS activity of hGSTA1 was confirmed using pure recombinant hGSTA1 incubated with 5,6α-EC and HA for 30 minutes, which showed the presence of an MS peak with the expected mass of DDA (M+1 peak of m/z=514.43), which was further confirmed by the presence of a fragmentation peak at M+1-H<sub>2</sub>O of m/z=496.44 (Fig. 3C), characteristic of DDA (10). Next, we measured the enzymatic parameters of pure recombinant hGSTA1-1 towards [<sup>14</sup>C]-5,6α-EC and HA for DDA

biosynthesis. hGSTA1-1 catalyzed the biosynthesis of DDA in a saturable manner with a  $K_m$  of  $0.27 \pm 0.05$  and  $0.35 \pm 0.3$   $\mu\text{M}$  for 5,6 $\alpha$ -EC and HA, respectively. Analysis of the velocity of the conjugation gives  $V_m$  of  $0.81 \pm 0.2$  and  $0.66 \pm 0.2$   $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg prot}^{-1}$  for 5,6 $\alpha$ -EC and HA, respectively (Fig. 3D). No conjugation occurred when 5,6 $\alpha$ -EC was replaced by 5,6 $\beta$ -EC in the presence of hGSTA1 and HA, demonstrating the selectivity of the enzyme for 5,6 $\alpha$ -EC. We next tested the DDAS activity of HepG2 cells which were reported by the HPA to express significant amounts of hGSTA1 mRNA (nTPM=97.3) and used MCF-7 cells as a hGSTA1-negative cell line (nTPM= 0.1). We confirmed the expression of hGSTA1 in HepG2 cells at the protein level and measured a DDAS activity, while MCF-7 cells were found to be hGSTA1- and DDAS-negative (Fig. 3E). Knockdown of hGSTA1 expression in HepG2 resulted in a loss of DDAS activity (Fig 3F). Taken together these data demonstrate that hGSTA1-1 is a DDAS.



**Fig 3. A)** The functionality of hGSTA1-1 was validated by incubating 10 g protein from cellular extracts of transfected cells in the presence of 100  M CDNB and 100  M glutathione for 30 min. The absorbance at 345 nm was measured. **B)** Cells were incubated 48 hours with 1  M [14C]5,6 -EC and 100  M HA and analyzed for DDAS activity. A representative TLC autoradiogram (n=5) of lipidic extracts from cell media is shown. **C)** MS analysis of extracts of pooled 10 reactions resulting from the incubation of 2  g hGSTA1 with 200 nM 5,6 -EC and 100  M HA. The extract was characterized by mass



spectrometry which gave the expected mass of DDA (MS1) of 514.43 and a MS2 dehydration fragment of 496.44,  $n=3$ . **D**) Enzymatic parameters of DDA biosynthesis were determined by incubating 2  $\mu\text{g}$  hGSTA1 and increasing concentrations of HA (0.1–100  $\mu\text{M}$ ) and 200 nM [ $^3\text{H}$ ]5,6 $\alpha$ -EC or increasing concentrations of [ $^3\text{H}$ ]5,6 $\alpha$ -EC (0 to 500 nM) and 100  $\mu\text{M}$  HA,  $n=3$ . **E**) Immunoblot analysis of hGSTA1 expression in HepG2, shControl (shCTRL) and shGSTA1-HepG2 cells (sh1-3) and **F**) Quantitative analysis of DDA production in these cells incubated with 1  $\mu\text{M}$  [ $^{14}\text{C}$ ]5,6 $\alpha$ -EC and 10  $\mu\text{M}$  HA for 48 h. Results are the mean ( $\pm$ SEM) of five independent experiments. **G**) Measure of the DDAS activity of pure recombinant members of the GST family: GSTA1-1, GSTA2-2, GSTA3-3, GSTA4-4, GSTM1-1, GSTM2-2 and GST P1-1. **H**) Chemical structure of DDA and of its bile acid derivative DDA-BA. **I**) DDA biosynthesis was carried out by incubating 2  $\mu\text{g}$  hGSTA1-1, 200 nM [ $^3\text{H}$ ]5,6 $\alpha$ -EC and 10  $\mu\text{M}$  HA in the presence of increasing concentrations of DDA or DDA-BA. **K**) X ray structure analysis of DDA bound in the active site of hGSTA1. The dimer of hGSTA1-1 is represented. Alpha helices are in red, and beta sheets are in light blue. The position of DDA in the active site is shown as light grey sticks. All residues with atoms less than 5  $\text{\AA}$  away from DDA are represented as sticks and labelled. **L**) 2D mapping of the DDA binding site on hGSTA1-1. Light green: amino acids involved in van der Waals interactions, Green: amino acids involved in hydrogen bond interactions; pink: amino acids involved in alkyl-alkyl or pi-alkyl interactions; orange: pi-sulfur interaction. Results are the mean ( $\pm$ SEM) of five independent experiments performed in triplicate.

Although the alpha classes of GSTs have shared the ability to glutathionylate CDNB, some have been reported to have endogenous metabolic activities. hGSTA3-3 and hGSTA1-1 have been shown to display a GSH-dependent steroid isomerase activity (33, 34), while the GSTA4-4 isoform catalyzes the glutathionylation of hydroxynonenal (35, 36). Among, the GST isoforms tested (A1-1, A2-2, A3-3, A4-4, M1-1, M2-2, T1-1), we found that hGSTA1-1 and hGSTA3-3 display a conjugation capacity on 5,6- $\alpha$ EC with HA (Fig. 3G). These data established that among the different classes of GSTs, only hGSTA1-1 and hGSTA3-3 displayed a DDAS activity. However, the expression of GSTA3-3 is very low in human tissues, and hGSTA3-3 is negligibly expressed in the breast compared to hGSTA1-1 at the mRNA level and not detected at the protein level.

We next investigated the DDAS activity of hGSTA1-1 at the molecular level. While our first attempt to crystallize the enzyme in the presence of 5,6 $\alpha$ -EC, HA or DDA failed, we produced a highly soluble bile acid form of DDA named DDA-BA (Fig. 3H). This compound inhibits DDAS activity with an extremely high potency with an  $\text{IC}_{50}$  of  $78.9 \pm 0.3$  nM (Fig. 3I) which corresponds to a 289 fold increased affinity compared to DDA ( $\text{IC}_{50}$  of  $22.8 \pm 0.5$   $\mu\text{M}$ , Fig. 3I). We obtained crystals of complexes hGSTA1-1/DDA-BA (Fig. 3K). In this structure, hGSTA1-1 adopts the classical dimeric organization that has been previously reported (37). The C-terminal helix, which has been reported to be potentially disordered in apo hGSTA1-1, displays a clear electron density. A bound DDA-BA molecule is observed in both molecules of the asymmetric unit, in an identical conformation (Fig. 3K), with a refined occupancy of XX (chain A) and YY (chain B). The electron density associated to the HA moiety is weak and only allows the positioning of the aminoethyl part of HA (supplementary figure X). In the observed conformation of DDA-BA, the sterol rings establish alkyl-alkyl or pi-alkyl interactions with the side-chain atoms of Phe10, Arg15, Leu107, Leu108, Val111, Leu199, Ala216 and Phe222 (Fig. 3L). We observed van der Waals interactions between Tyr9, Met208, Ala12, Arg13, Glu104, Pro110 and the steroid backbone of DDA-BA. The carboxyl group established two high energy hydrogen bonds with Ser212 and Gly14 (Fig. 3L). The  $\alpha$  nitrogen of the HA moiety established a high energy hydrogen bond with Arg 15. Met108 from the B chain established a pi-sulfur interaction with the imidazol ring of the HA moiety complexed with the A chain (Fig. 3L). The hydroxyl group at C5 of the steroid backbone is hydrogen bonded to water molecules, and that at position C3 lies in the disordered solvent that fills the large cavity at the interface of the dimer of hGSTA1-1 (Fig. 3L). The imidazole ring of the HA moiety also lies in this large cavity, where a unique interaction with polar protein atoms could stabilize a unique conformation. This is the first structure of hGSTA1-1 in the presence of a sterol derivative that illustrates its implication in DDA biosynthesis.

Taken together these data established that hGSTA1-1 is a DDAs. We further established that DDAs activity is also measured with hGSTA3-3 but not with other tested GST. We provide

the first evidence at the molecular level that DDA-BA interacts strongly with hGSTA1-1 subunits.

**Determination of the pharmacological profile of DDAS.** Since DDA is a bioactive oxysterol with tumor suppressor properties, we investigated the pharmacological profile of hGSTA1-1 for DDA biosynthesis. First, we found that CDNB and GSH, the reference substrates of GST, inhibited DDAS activity. A similar observation was made with natural substrates and products of hGSTA1-1.  $\Delta^5$ -pregnene-3,20-dione ( $\Delta^5$ -Pr) and  $\Delta^4$ -pregnene-3,20-dione ( $\Delta^4$ -Pr) inhibited the DDAS activity in a concentration-dependent manner with  $IC_{50}$  of  $1.00 \pm 0.59 \mu M$ ,  $93.14 \pm 0.47 nM$ ,  $21.09 \pm 0.45 \mu M$  and  $50.53 \pm 0.46 \mu M$  respectively (Fig. 4A). B-ring oxysterols (OS) from the OCDO biosynthetic branch that are produced in BC such as 5,6 $\beta$ -EC, CT and OCDO strongly inhibited DDAS activity with  $IC_{50}$  of  $0.52 \pm 0.05$ ,  $0.93 \pm 0.04$  and  $0.69 \pm 0.06 \mu M$  respectively (Fig. 4B). Other B-ring OS such as, 7-ketocholesterol (7KC) and 7 $\beta$ -hydroxycholesterol (7 $\beta$ HC), also inhibited DDAS activity with  $IC_{50}$  of  $0.86 \pm 0.05 \mu M$  and  $1.36 \pm 0.06 \mu M$  respectively. In contrast, side-chain oxysterols such as 22(R)-hydroxycholesterol (22(R)HC), 27-hydroxycholesterol (27-HC) or 25-hydroxycholesterol (25HC) failed to inhibit DDAS activity of hGSTA1 up to  $20 \mu M$  (Fig. 4B). Another series of bioactive B-ring oxysterol derived from the 7-dehydrocholesterol epoxide pathway (38) were next tested. 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxy-cholest-7-ene-3 $\beta$ -ol (DHCE), 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -dihydroxycholest-7-en-6-one (DHCEO), 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxycholest-6-en-3 $\beta$ -ol (DHCEP), 3 $\beta$ -hydroxy-5-oxo-5,6-secocholestan-6-al (seco-A), 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\beta$ -hydroxy-B-norcholestan-6 $\beta$ -carboxaldehyde (seco-B) inhibit DDAS activity with  $IC_{50}$  of  $0.27 \pm 0.06 \mu M$ ,  $0.46 \pm 0.05 \mu M$ ,  $0.32 \pm 0.05 \mu M$ ,  $1.69 \pm 0.07 \mu M$  and  $1.19 \pm 0.08 \mu M$ , respectively, whereas 7-dehydrocholesterol (DHC) did not inhibit DDAS (Fig. 4C).

We next investigated the impact of CT-BA a high affinity bile acid analogue of CT which displays a 22 fold increased affinity for hGSTA1 compared to CT ( $IC_{50} = 44.28 \pm 1.3 nM$ ) (Fig. 4D) and high water solubility. We obtained crystals of complexes hGSTA1-CT-BA. As seen for DDA-BA, hGSTA1 adopts the classical dimeric organization (Fig. 4E). A bound CT-BA molecule is observed in both molecules of the asymmetric unit, in an identical conformation (Fig. 4E), with a refined occupancy of XX (chain A) and YY (chain B). In the observed conformation of CT-BA, the sterol rings establish alkyl-alkyl or pi-alkyl interactions with the side-chain atoms of Phe10, Leu107, Leu 108, Val111, Leu199, Ala216 and Phe222 (Fig. 4F). We observed van der Waals interactions between Tyr9, Met208, Ala12, Arg13, Pro110 and the steroid backbone of CT-BA. The carboxyl group established as seen with DDA-BA two high energy hydrogen bonds with Ser212 and Gly14 (Fig. 4F). Importantly, Arg15 established a high energy H-bond with the C6 OH from CT-BA. A van der Waals interaction was observed between the ring A of the steroid backbone and the Lys127 from the chain B of the hGSTA1 dimer (Fig. 4F).

When tested in a whole cell assay, 5,6 $\beta$ -EC, CT and OCDO were found to be potent inhibitors of DDAS activity (Fig. 4G) confirming the potency of these oxysterols to inhibit DDAS activity on an integrated system.

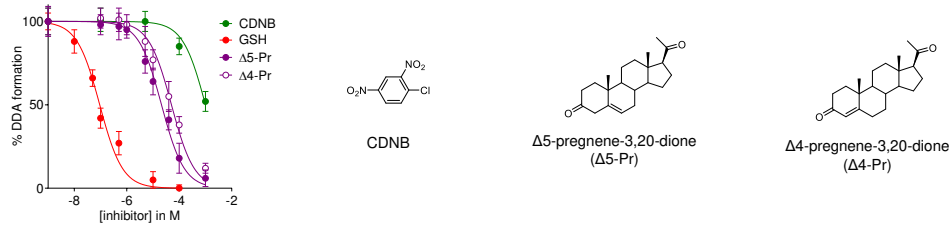
Curcumin is a dietary phytochemical compound that displays chemopreventive properties on BC (39), modulates autophagy (40) and activates an antitumor immune response (41). Curcumin controls the antioxidant pathway driven by NRF2 (42, 43) and AHR (44-46) possibly through epigenetic mechanisms (47). Interestingly, both AHR and NRF2 were reported to control the expression of GSTA1. Whether curcumin regulates DDA production in cancer cells is currently unknown. Therefore, we next tested the effect of curcumin on hGSTA1 expression and DDAS activity in HepG2 (hGSTA1(+)) and MCF-7 (hGSTA1(-)) cells and used DDA for comparison. We found that curcumin and, surprisingly, DDA stimulated hGSTA1 expression and DDAS activity in HepG2 cells (Fig. 4H-I), whereas only DDA was active on



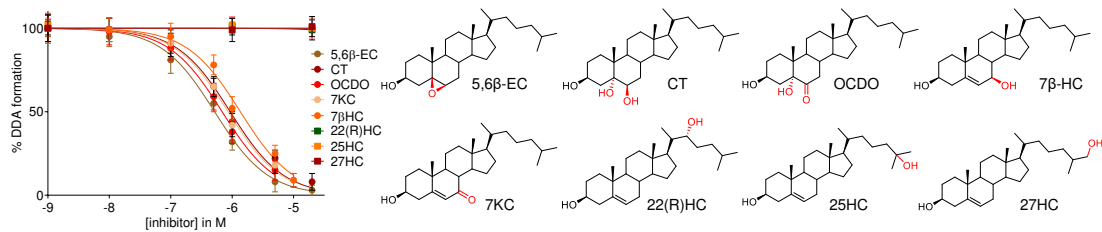
MCF-7 cells, suggesting that stimulation of DDAS activity is pharmacologically possible but cell type dependent. We next tested other compounds previously reported to stimulate hGSTA1 expression or known to control cell fate on HepG2 cells. Compounds stimulate hGSTA1 expression to varying degrees but were inefficient to stimulate DDAS activity. Interestingly, OCDO decreased hGSTA1 expression and DDAS activity (Fig. 4. K-L). Among the tested compounds, only DDA and curcumin were found to be able to activate DDAS activity, suggesting that factors other than hGSTA1 are required.

Taken together, these data demonstrate that pharmacological inhibition and activation of DDAS activity is possible. We found that B-ring oxysterols are potent inhibitors of DDAS activity on the recombinant enzyme and in a whole-cell assay, whereas side-chain oxysterols are not, and provide the first molecular level evidence that a B-ring oxysterol binds to hGSTA1. The most potent inhibitors of DDAS activity, in addition to the B-ring oxysterols, were the bile acid derivatives of DDA (DDA-BA) and CT (CT-BA). We found that curcumin can activate hGSTA1 expression and DDAS activity in HepG2 cells, whereas DDA was active in both cell lines. Finally, we found that hGSTA1-1 is necessary but not sufficient to enable DDAS activity in whole cell assays.

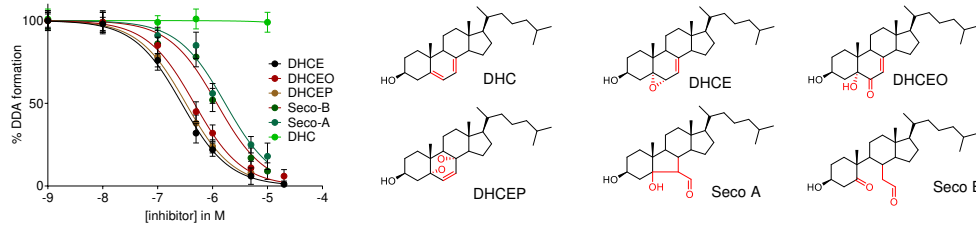
A



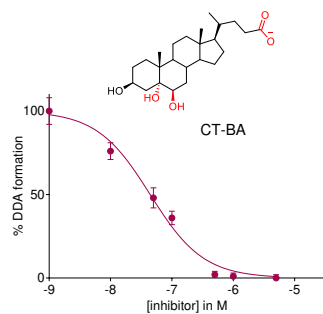
B



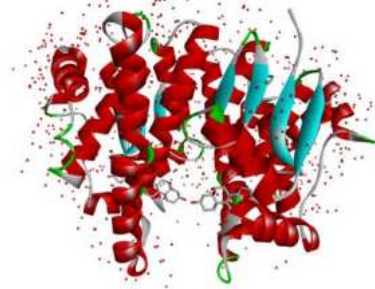
C



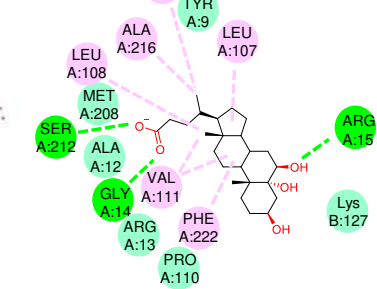
D



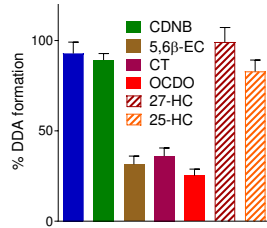
E



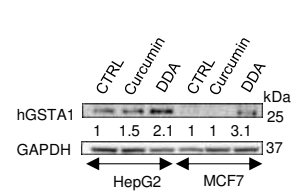
F



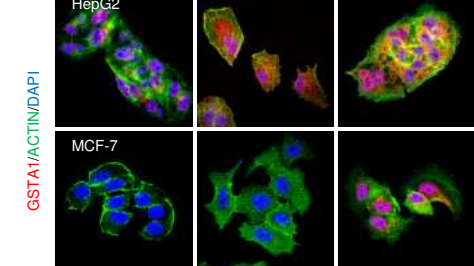
G



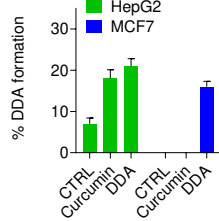
H



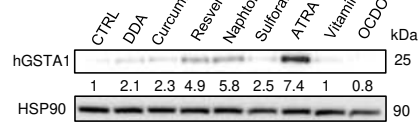
I



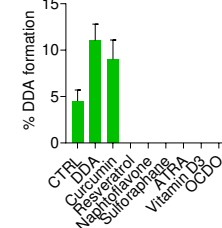
J



K

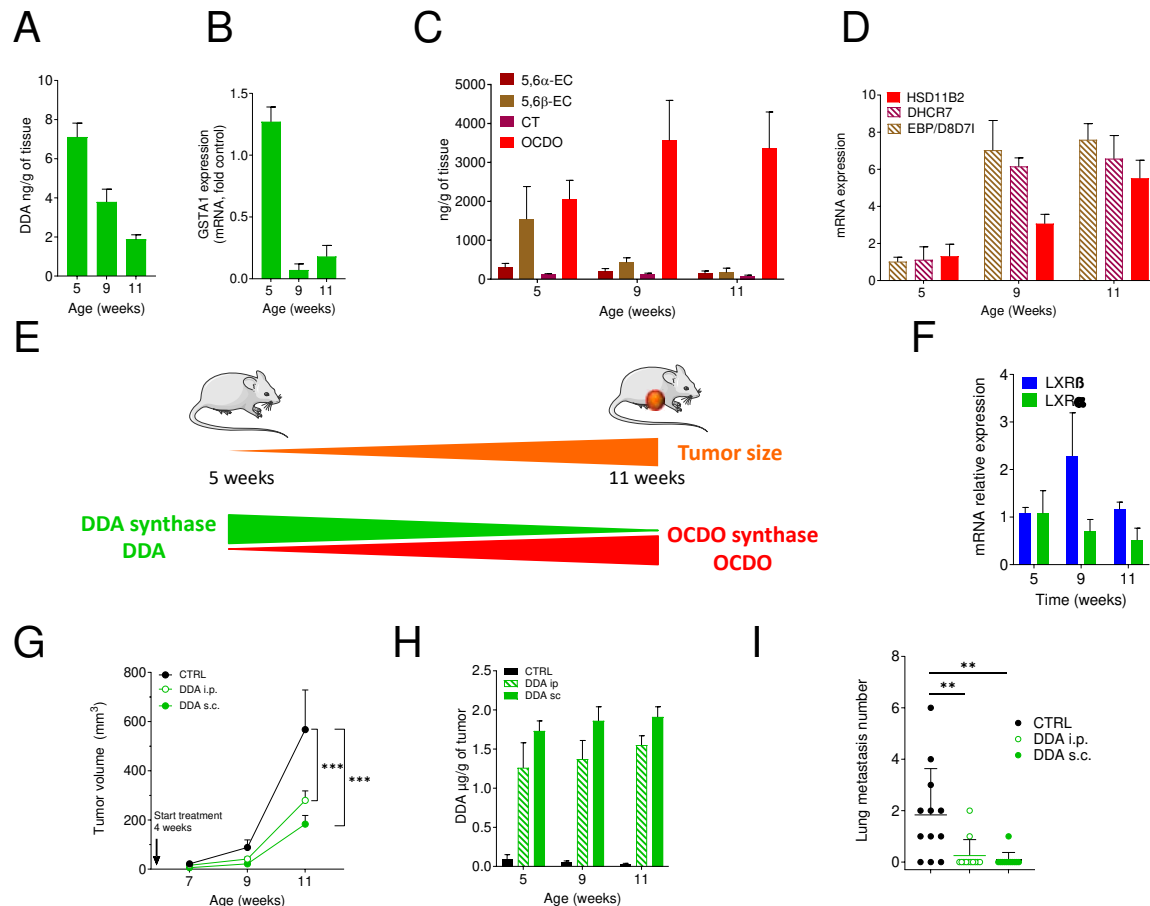


L



**Fig 4.** DDA biosynthesis was carried out by incubating 2  $\mu$ g hGSTA1, 200 nM [3H]5,6 $\alpha$ -EC and 10  $\mu$ M HA in the presence of increasing concentrations of **A**) CDNB, GSH,  $\Delta$ 5-pregnene-3,20-dione ( $\Delta$ 5-Pr) and progesterone (Pro); **B**) 5,6 $\beta$ -EC, cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol (CT), 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol (OCDO), 7 $\beta$ -hydroxycholesterol (7 $\beta$ HC), 7-ketocholesterol (7KC), 22(R)-hydroxycholesterol (22(R)HC), 25-hydroxycholesterol (25HC) and 27-hydroxycholesterol (27-HC); **C**) 7-dehydrocholesterol (DHC), 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxy-cholest-7-ene-3 $\beta$ -ol (DHCE), 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -dihydroxycholest-7-en-6-one (DHCEO), 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epidioxycholest-6-en-3 $\beta$ -ol (DHCEP), 3 $\beta$ -hydroxy-5-oxo-5,6-secocholestan-6-al (seco-A), or 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\beta$ -hydroxy-B-norcholestan-6 $\beta$ -carboxaldehyde (seco-B). **D**) CT and CT-BA were tested for DDAS inhibition using the hGSTA1 recombinant protein as described above. DDAS activity is reported on the graph. **E**) X ray structure analysis of CT-BA bound in the active site of hGSTA1. The dimer of hGSTA1-1 is represented. Alpha helices are in red, and beta sheets are in light blue. The position of CT-BA in the active site is shown as light grey sticks. All residues with atoms less than 5  $\text{\AA}$  away from CT are represented as sticks and labelled. **F**) 2D mapping of the CT-BA binding site. Light green: amino acids involved in van der Waals interactions, Green: amino acids involved in hydrogen bond interactions; pink: amino acids involved in alkyl-alkyl or pi-alkyl interactions. **G**) Whole cell assay on DDAS activity inhibition. HepG2 cells were incubated 48 h in the presence of 1 mM CDNB, or 1  $\mu$ M of 5,6 $\beta$ -EC, CT, OCDO, 27-HC or Pro and assayed for DDA biosynthesis. **H-I**) Cells were treated 48h with 15  $\mu$ M curcumin or 1 $\mu$ M DDA. The impact of HepG2 and MCF-7 cells treatment on GSTA1 expression visualized by western blot (H) and immunocytochemistry (I). Blue: DAPI, green: actin; Red: hGSTA1. **J**) HepG2 and MCF-7 treated as above were analyzed for hGSTA1 expression and DDAS activity. **K**) HepG2 cells were treated with various compounds for 48h. The expression of hGSTA1 was measured by western blot and **L**) for DDAS activity. Results are the mean ( $\pm$ SEM) of three independent experiments performed in triplicate.

**5,6-ECs Metabolism in a Spontaneous Mouse Model of BC.** The PyMTTg mouse is a transgenic model that spontaneously develops tumors in the mammary glands. This mouse model recapitulates human breast cancer progression *in vivo* (28, 48, 49), and cholesterol has been shown to accelerate and enhance tumor formation in this spontaneous BC model (50). We analyzed the 5,6-EC metabolic pathway in the mammary gland during tumor development at week 5 (preneoplastic stage), week 9 (palpable tumor) and week 11 (developed tumor). We found that DDA levels decreased in the mammary gland from week 5 to week 11 (Fig. 5A), and this was accompanied by a decrease in the expression of the mRNA encoding *Gsta1* (Fig. 5B). In contrast, OCDO levels increased from week 5 to week 11, while its precursors 5,6 $\alpha$ -EC and 5,6 $\beta$ -EC levels decreased, and low levels of CT were detected at all ages, reflecting an active transformation of the pathway towards OCDO production (Fig. 5C). Changes on the 5,6-EC metabolic profile in favor of OCDO production were associated with an increase in the expression of the mRNA encoding the enzymes involved in OCDO biosynthesis (Fig. 5D): 3 $\beta$ -hydroxysteroid- $\Delta^{8,7}$ -isomerase (EBP/D8D7I) and the 3 $\beta$ -hydroxysteroid- $\Delta^7$ -reductase (DHCR7), which form cholesterol-5,6-epoxide hydrolase (ChEH), and the 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase of type 2 (HSD11B2), which oxidizes CT to OCDO, in accordance with the decrease in 5,6-EC levels, the low level of CT and the increase in OCDO production (Fig. 5C-D). Taken together these data show that a deregulation in 5,6-EC metabolism occurs during tumor development in PYMT-Tg mice as summarized in Fig. 5E. This metabolic switch was associated with 50% decrease in LXR $\alpha$  expression and a 2 fold increase in LXR $\beta$  expression at 9 weeks with a return to the initial level at 11 weeks (Fig. 5F), LXRs are DDA receptors (16). We next showed that administration of DDA to mice reduced tumor development (Fig. 5G), this was associated with the uptake of DDA in tumors, which reached pharmacologically active concentrations (Fig. 5H). Interestingly, both *i.p.* and *s.c.* mode of DDA administration decreased significantly lung colony formation showing that DDA significantly decreases tumor spreading (Fig. 5I). Taken together, these data demonstrate that an imbalance in the DDA/OCDO ratio occurred during mammary tumor development in PyMTTg mice and that supplementation of DDA significantly delayed tumor development. This shows that this mouse model which recapitulates the human pathology in several aspects (28), also shows similarities in terms of imbalance of DDA and OCDO levels.



**Fig 5.** The 5,6-EC metabolic branch in PyMT-Tg mouse mammary gland. The mammary gland of mice (n=5/group) were prepared as described in the « material and methods » section for **A**) measurement of DDA levels. DDA was quantified by UPLC-MS and expressed as ng of DDA by g of tissue. **B**) qPCR analyses of *Gsta1*. **C**) 5,6-EC, CT and OCDO were quantified by GC/MS and represented in μg/g of tissue. **D**) qPCR analyses of ChEH subunits (DHCR7 and D8D7I) and OCDO synthase (HSD11B2) expression. **E**) Scheme summarizing metabolic changes observed in the mammary gland of PyMT-Tg mice according their age. **F**) expression of LXRα and LXRβ at the mRNA level. 5 mice Tg+ per age, data are the mean value of duplicate measurements (±SEM)). **G**) Effect of DDA on tumor development. Mice (n=10/group) were treated 5 days a week starting at 4.5 week age with solvent vehicle (intraperitoneally, i.p.), or 5mg/kg DDA i.p., 5mg/kg DDA injected sub-cutaneous (s.c.). The tumor volumes were measured once a week starting at week 7 (mean ± SEM) (statistic: 2 way anova with Bonferroni's multiple comparisons test \*\*\* p<0.0001). **H**) Measurement of DDA levels in tumors from control mice and DDA treated mice. **I**) Tumor number in lung from mice untreated or treated with DDA 5mg/kg i.p. or s.c. in the absence of in the presence of OCDO at 5 μg/kg. (10 PyMT-Tg mice per group (±SEM)).

## Discussion

Using a combination of approaches, we demonstrate here that hGSTA1-1 is a DDAS. We show that the purified recombinant enzyme catalyzes DDA biosynthesis *in vitro* and that knockdown of the enzyme in HepG2 cells abolishes DDAS activity.

hGSTA1 was found selectively expressed in the epithelial cells of the milk ducts and terminal lobules, revealing the cellular origin of DDA production in the breast. A recent study using single cell transcriptomic analysis shows that hGSTA1 was in “luminal adaptative secretory precursors” (51) confirming the selective cellular expression of the enzyme among the 12 different cell types identified in the breast (51). In human breast, the endogenous concentrations of HA and 5,6α-EC are approximately 12 μM (52) and 0.5 μM (8), respectively. These concentrations are higher than the enzyme Km for 5,6α-EC and HA, supporting DDAS activity mediated by hGSTA1 in the breast.

The DDAS activity is stereoselective for 5,6α-EC with no activity for 5,6β-EC, exactly as observed for the chemical conjugation of 5,6-EC with aminoethanol in the presence of a

catalyst (22), showing that this selectivity is mainly driven by the peculiar reactivity of the oxirane ring at C5-C6 at the junction of the A- and B-rings of the steroid backbone.

The conjugation reaction catalyzed by hGSTA1-1 with HA was selective for 5,6 $\alpha$ -EC, while no reaction occurred with 5,6 $\beta$ -EC. This provides another example of diastereomeric preference for 5,6 $\alpha$ -EC metabolism over 5,6 $\beta$ -EC, in addition to what has been shown for fatty acid esterification by ACAT1, sulfation by SULT2B1b, and binding to liver X receptors (8), illustrating different physiological roles for the 5,6-EC diastereoisomers.

We found that hGSTA1-1 and hGSTA3-3 display a DDAS activity, while other tested GST do not display DDAS activities. This recapitulates the selectivity of these two GSTA isoforms in their steroid isomerase activities. Indeed, it was shown the key importance of Phe10 and Ala216 that are present in hGSTA1 and hGSTA3 but replaced in GSTA2 by Ser10 and Ser216 respectively (33). hGSTA3 is weakly expressed in the human tissues (supplementary figure 1C) but expressed in the skin (mainly in melanocytes and keratinocytes, the Human Protein Atlas) and testis (sertoli and leydig cells) in which GSTA1 was reported to be weakly and not expressed respectively. While we found that DDA induce melanoma cells redifferentiation into melanocytes (10, 21), autophagic cell death (16), and the induction of an antitumor immune response against melanoma tumors (12), the eventual role of GSTA3-3 on skin and testis physiology with regard to DDA production will deserve further investigations.

5,6 $\beta$ -EC is an inhibitor of DDAS, suggesting that increased levels of 5,6 $\beta$ -EC produced by oxidative stress and lipoperoxidation (53, 54) may inhibit DDA production, suggesting that inflammatory conditions may be detrimental to DDA biosynthesis. In addition, levels of some of the B-ring oxysterols tested, such as 5,6 $\beta$ -EC, CT or DHCEO, can be dramatically increased in patients with Niemann-Pick C1 disease (55), Smith-Lemli-Opitz syndrome (38) and some other diseases associated with impaired development (56-58). Since these B-ring oxysterols are potent inhibitors of DDAS, this suggests that DDA biosynthesis may be inhibited at an early stage in these syndromes due to the accumulation of these oxysterols. The measurement of DDA levels in these pathologies deserves further investigation and may eventually offer possible complementary strategies using exogenous DDA to be tested.

The tumor promoter oncosterone (OCDO) has been shown to inhibit DDAS activity with an IC<sub>50</sub> of 0.5  $\mu$ M, which is in the lower range of OCDO concentrations found in BC tumor biopsies from patients (9). This suggests that ectopic expression of OCDO synthase in BC and OCDO biosynthesis contribute to the weakening of breast tissue against carcinogenic insults. This evidences for the first time a new function of hGSTA1 on BC chemoprevention through its DDAS activity. Interestingly, we observed a gradient in the expression of hGSTA1, showing a gradient of low expression close to the tumor and higher expression distal to the tumour. This may reflect the fact that OCDO-producing tumors may inhibit DDAS activity and expression, thereby favouring the carcinogenic process.

The fact that B-ring oxysterols and bile acid derivatives of CT and DDA were extremely potent inhibitors of DDAS activity demonstrated a regulatory loop on DDAS activity comparable to that found for OCDO biosynthesis. Indeed, we have shown that DDA inhibits OCDO biosynthesis at the ChEH enzyme step.(6, 7, 9).

In the search for DDAS activators, we found that curcumin was effective in stimulating DDAS activity in HepG2 but not in MCF-7. DDAS activity requires efficient transport of the substrate 5,6-EC and HA as well as gating of substrates to the enzyme. The differential expression in favour of HA and 5,6-EC uptake transporters in HepG2 compared to MCF-7 may explain this difference (supplementary figure). One can also consider that endogenous DDAS inhibitors may be present and vary depending on the cell type.

Here we report a decreased expression of DDAS and DDA production in BC samples compared to normal tissues. This is consistent with previously published observations using non-selective anti-GSTA1 antibodies (59), with increased levels of 5,6-ECs, CT and OCDO



(9), and HA (52, 60, 61) measured in breast tumors, and increased levels of 5,6 -EC found in breast epithelial hyperplastic tissue (62). This supports the existence of a metabolic imbalance between DDA and OCDO in normal tissue and BC that may either control or stimulate BC progression. We found that DDAS expression reflected DDA levels in BC tissue, demonstrating that measurement of hGSTA1 expression could complement quantification of DDA levels to diagnose deregulation of this pathway in BC. DDA has been shown to be active in inducing differentiation and death of tumor cell lines of different tissue origin that do not contain measurable amounts of DDA (10, 21) and do not or weakly express hGSTA1 (63). Furthermore, the level of hGSTA1 expression in BC was found to be associated with patient survival, as was the hGSTA1/HSD11B2 ratio (supplementary Figure 5), suggesting that this metabolic imbalance may also be predictive of response to various therapeutic strategies in BC. The observation that DDAS is selectively expressed in mammary epithelial cells from lactating ducts and lobular terminal units, which are at the origin of most BC, highlights that loss of DDAS expression and DDA biosynthesis may represent a major oncogenic process leading to BC that could be counteracted by complementation with DDA.

#### Material and Methods:

**Chemicals.** [<sup>14</sup>C]Cholesterol (58 mCi/mmol) and [<sup>3</sup>H]cholesterol (53 Ci/mmol) were purchased from Perkin Elmer. Sterols, oxysterols and drugs were from Steraloids or Sigma-Aldrich. DDA, 5,6 -EC and 5,6 -EC were synthesized in our laboratory according to published procedures (10, 64). Solvents were from Sigma, Fischer, Scharlau or VWR. TLC plates were from Macherey Nagel. C18 Sep-Pack cartridges were from Waters.

**Measurement of glutathione transferase activity.** Glutathione transferase activity was measured according to the method of Habig et al (65). Recombinant human GSTA2, A3, A4, M1, M2 and P1 were prepared by previously published procedures (66). Briefly, 2 g of hGSTA1 (NBP1-30307, Novus company) were incubated in the presence 1 M to 100  M of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, Sigma) in EtOH (final concentration in EtOH: 2.85% vol/vol) and 1 mM glutathione in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0). The mixture was incubated for 30 min at 30 C and the reaction was stopped with 200 l cold MeOH. Measurements were carried out spectrophotometrically at 345 nm ( $A_m=8.5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). The negative control corresponds to the same test performed in absence of hGSTA1. Inhibition tests were conducted under similar conditions in the presence of 2 g of hGSTA1 1  M CDNB and inhibitors at the given concentration. Experiments were conducted 3 times in triplicates.

#### Preparation and production of pure recombinant and functional hGSTA1.

**Molecular Biology.** The human GSTA1-1 (Ala2-Phe222) coding sequence was amplified by PCR from a pCMV6-AC mammalian vector, using the following primers (Eurofins): forward: 5'GGAGATATACATATGGCAGAGAAGCCCAAGCT3' and backward: 5'GTGGTGGTGGTGGTGTAAAACCTGAAAATCTTCCTTGCTTCT3'. In the primers, the underlined sequences are the specific flanking sequences required to generate the overhangs necessary for In-Fusion cloning of the gene into the procaryote pET29 vector. The non-underlined sequences represent the human GSTA1-1 gene-specific sequences. The DNA fragments obtained on a 1% agarose gel after PCR were excised, purified and inserted into a pET29-b(+) vector (Novagen) previously amplified by PCR using the In-Fusion compatible primers (Eurofins): 5'TTAAGCTTGCGGCCGCA3' and 5'TCGAGGTGCTCGGTCATATGT3'. The resulting recombinant pET29-hGSTA1 plasmid was then transformed into Rosetta<sup>TM</sup> 2(DE3)pLysS chemically competent cells for protein

expression and positive transformants were confirmed by colony PCR and sequencing using the T7 promoter primers.

The complete amino-acid sequence of the construct produced is:

MAEKPKLHYFNARGRMESTRWLLAAAGVEFEKFIKSAEDLDKLRNDGYLMFQQVP  
MVEIDGMKLVQTRAILNYIASKYNLYGKDIKERALIDMYIEGIADLGEMILLLPVCPPE  
EKDAKLALIKEKIKNRYFPAFEKVLKSHGQDYLVGNKLSRADIHLVELLYYVEELDSS  
LISSFPLLKALKTRISNLPTVKKFLQPGSPRKPPMDEKSLEEARKIFRF

**Protein expression.** The cultures were grown at 30 C in lysogeny broth medium supplemented with 30  g ml<sup>-1</sup> kanamycin and 25  g ml<sup>-1</sup> chloramphenicol until the mid-exponential phase of growth (OD600   0.5); protein expression was then induced using isopropyl  -d-1-thiogalactopyranoside at a final concentration of 1 mM and the cells were grown overnight at 16 C. The bacterial cells were harvested by centrifugation at 4000g, for 15 min and the resultant cell pellets were stored at -20 C until use.

**Purification of hGSTA1.** The cell pellet was resuspended in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM DTT, 1 mM EDTA) and lysed by sonication. Subsequently, the lysate was centrifuged at 4 C for 45 min at 35 000g, and the supernatant was purified. Briefly, after washing three times with sonication buffer, the Glutathione Sepharose 4B resin (Cytiva) was mixed with the supernatant. Then, the mixture was incubated at 4  C with rotation for 1 h. After loading to a 20 mL Econo-Pac  Chromatography Columns (Bio-Rad, country), the flowthrough was discarded and the resin was subsequently washed with lysis buffer and wash buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.2 M NaCl). The bound proteins were eluted with elution buffer (50 mM Glycine-NaOH, pH 10) and the 1 mL fractions were collected in tubes pre-filled with 1 mL of pH adjustment buffer (2M Tris-HCl, pH 7.2, 1 mM EDTA, 1 mM DTT). Finally, the fractions were pooled and dialyzed against 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM DTT, 10% glycerol. After concentration the protein was stored at -80 C until use.

**Structure determination.** The purified protein at 4.8 mg/ml was incubated 3 hours at 4 C in the presence 12 mM of DDA-BA. The resulting solution was used for crystallization using the vapour diffusion in hanging drops method: 1 microL of protein solution is mixed to 1  L of reservoir solution (0,2 M NaF, 25 % (w/v) PEG 3350). Crystals were soaked 24 hours in 25 mM of DDA-BA in the crystallization condition before being transferred in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at the beamline id23eh2 at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, France) at 100 K and at a wavelength of 0.8731  . Data were processed using AutoPROC (GlobalPhasing) (67), XDS (68) and CCP4 (69) (Table 1). Refinement was performed with buster/TNT (70), refmac5 (71) and coot (72) (Table2). Dictionaries for refinement were obtained from the Grade2 web server.

**Measurement of DDA biosynthesis by purified recombinant hGSTA1.** The final assay volume of 100 l with 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5), 2 g hGSTA1 (1 g/ l), was incubated with increasing concentrations of [<sup>3</sup>H]5,6 -EC (50nM to 500nM), HA (0.1 to 100 M). The mixture was incubated for 30 minutes at 30 C, and the reaction was stopped by addition of 200 l cold MeOH. After centrifugation 10 min at 18,000g (4 C), the supernatant was evaporated to dryness using a speed vac concentrator (Savant SP01010, Thermo Scientific) and the residue was resuspended in 20  l MeOH. Samples were spotted on HPTLC NanoSilgur10 x 10 cm plates (Macherey Nagel, ref 811042) and developed using CH<sub>2</sub>Cl/MeOH/ NH<sub>4</sub>OH 84 : 15 : 1 for DDA. Standards were co-spotted with samples. Plates were revealed by sulfuric acid impregnation and heating. The radioactivity was quantified by liquid scintillation counting of the ethanol extract of the silica scraped at the retention factor (*R<sub>f</sub>*) corresponding to authentic 5,6 -EC or DDA standards. For inhibition measurement 2  g



hGSTA1 was incubated with 200 nM [<sup>3</sup>H]5,6 -EC in the absence or in the presence of a given concentration of inhibitor.

**Cell culture.** Cells lines were from the American Tissue Culture Collection. All cell lines were grown in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37  C. All culture media contained penicillin and streptomycin (50 U ml<sup>-1</sup> each) and 1.2 mM glutamine. HepG2 (HB-8065) were grown in DMEM supplemented with 10% FBS. MCF-7 (HTB-22) and HEK293T (CRL-3216 ) cells were from the ATCC, and were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 1.2 mM glutamine, 5% fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin (50 units/mL) in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> at 37  C.

**Expression of hGSTA1 in HEK293T.** Cells were transfected using the Neon<sup>TM</sup> transfection system following the instructions of the Invitrogen Company (program 13, 5.10<sup>6</sup> cells). Cells were transfected with 4 g of a mock plasmid (pCMV6-AC, PS100020, Origene Company, Herford Germany) or a plasmid encoding hGSTA1 (pCMV6-hGSTA1, SC321900, Origene Company, Herford Germany). 10 g Proteins were separated on 4-12% SDS-PAGE gels (NuPAGE<sup>Novex</sup> Invitrogen 4-12% Bis-Tris protein gels, NP0335BOX), electro-transferred onto PVDF membranes and incubated overnight at 4  C with rabbit anti-GSTA1 (PA5-29811, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Ca, USA; dilution 1/1,000) or anti-Actin (C4, MAB1501, Millipore, dilution 1/10,000). Visualization was carried out using an ECL plus kit (Pierce), and revealed with the ChemiDoc<sup>TM</sup> MP Imaging System (Biorad). Immunocytochemistry was carried as previously described (10) using an anti-hGSTA1 (PA5-29811, Thermo Scientific, dilution1/500) and revealed with an anti-HRP secondary antibody (Abcam, Anti-Rabbit IgG, 1/500) after Giemsa staining.

**Measure of DDA biosynthesis in cells transfected with hGSTA1.** Transfected cells were seeded in 6-well plates at 100,000 cells per well in triplicate. After 24h, cells were incubated with [<sup>14</sup>C]5,6 -EC (0.072 Ci) in EtOH 0.1% and 100 M HA for 48h. Cells were then scraped and pelleted by centrifugation for 5 min at 1,400 rpm, and then extracted, developed and analyzed by TLC for DDA biosynthesis as described above with recombinant hGSTA1.

**MS experiments.** Mass spectrometry experiments were performed on an Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific) equipped with a HESI-II probe electrospray ionization source operating in positive mode. Samples were introduced using a syringe pump and a 500  L syringe (Thermo Scientific) at a flow rate of 10  L/min. The Exactive MS was tuned using a 100 fmol/ L DDA solution to optimize parameters. Optimized parameters were as follows: spray voltage, 3.8 kV; heated capillary temperature, 150 C; capillary voltage, 82.50 V; tube lens voltage, 185 V; skimmer voltage, 34 V, sheath gas (nitrogen) flow rate, 20 (arbitrary units); auxiliary gas flow rate, 10 (arbitrary units). The instrument was set to a maximum injection time of 50 ms with 2 microscans per spectrum. The data were acquired via the ThermoExactive Tune software.

**Measurement of DDAS activity in HepG2 cells.** Cells were seeded in 6-well plates (1x10<sup>5</sup> cells per well) in triplicate. After 24h, the cells were incubated with [<sup>14</sup>C]5,6 -EC (0.072 Ci) in EtOH 0.1% and HA at 100 M for 48h in the absence or in the presence of 1  M DDA, 15  M curcumin, 15  M resveratrol, 1  M Naphtoflavone, 10  M sulforaphane, 1  M all-trans-retinoic acid (ATRA), 1 M vitamin D3 or 1  M OCDO. The media were collected, and the cells were then scraped, pelleted by centrifugation for 5 minutes at 1,400 rpm, and both the media and cell pellets were extracted, developed, and analyzed by TLC for DDA biosynthesis using recombinant hGSTA1, as described above.

**Knockdown of hGSTA1 expression in HepG2 cells.** The plasmids pGFP-C-shLenti encoding shGSTA1(sequence A (Lv-GFP-shTL304183A), sequence B (Lv-GFP-shTL304183B), sequence C

(Lv-GFP-shTL304183C), sequence D (Lv-GFP-shTL304183D) and non targeting negative control shRNA consisting of a random sequence and a positive control GAPDH shRNA lentivirus (Lv-GFP-shCTRL) were from OriGene (OriGene Technologies GmbH, Herford, Ge). For transduction experiments, HepG2 cells were seeded onto 12-well plates (30,000 cells per well) and incubated for 24 h at 37 C with 5% CO<sub>2</sub> in DMEM 10% FBS without antibiotics. The concentrated viral supernatant containing lentivirus that express shRNA targeting GSTA1 (shGSTA1-1, 2 and 3) or non-specific shRNA (sh-Control) were added into the culture medium at a multiplicity of infection (MOI) of 20 in the presence of protamine sulfate (5  g/ml). One day after transduction, this medium was replaced with complete medium. After 72 h, puromycin was added to the medium at 1  g/ml for stable GSTA1 knock-down selection. For metabolic studies, HepG2-shControl, shGSTA1 were plated into six-well plates (1x10<sup>5</sup> cells per well) in the appropriate complete medium. One day after seeding, this medium was replaced with a complete medium, and cells were treated with [<sup>14</sup>C]5,6 -EC (0.072 Ci) in EtOH 0.1%. and HA at 100 M for 72h. DDAS activity was performed by TLC as described above. Production and cells transductions were fulfilled in the “Plateau de Vectorologie, at the “P le Technologique du CRCT” (Toulouse, France).

**Patient samples and preparation of tissues.** All human samples were collected with the approval of institutional review board of the Purpan University Hospital and the tumor bank committee of the Claudius Regaud Institute, IUCT Toulouse. Written informed consent was obtained before inclusion in this study. Patients’ clinical characteristics and tumor pathological features were obtained from the medical reports and followed the standard procedures in our institution. These samples were tested for 5,6-EC, CT and OCDO levels measurement and OCDO biosynthesis enzymes expression (9). Normal and tumor human tissues obtained by surgical resection were stored frozen at -80  C and thawed in ice before use. Tissues were homogenized at 4  C in buffer A (50 mM Tris, 0.5% butylated hydroxytoluene (5 mg ml<sup>-1</sup>), 150 mM KCl, pH 7.4) (5 vol g<sup>-1</sup> of tissue) with a Polytron B homogenizer and centrifuged 5 min at 2,500 r.p.m. Homogenates and sera were diluted with buffer A to obtain samples at 10 mg protein per ml. Quantification of DDA from tumors and normal matching tissues was done exactly as previously described (10).

**Immunohistochemistry.** Human tissues were analyzed for hGSTA1 expression. Immunohistochemical staining was done on paraffin-embedded tissue sections, using a specific anti-human hGSTA1 antibody (PA5-29811, Thermo Fisher Scientific, town, country?). Immunostaining of paraffin sections was preceded by an antigen retrieval technique by heating in 10mM citrate buffer, pH 6, with a microwave oven twice for 10 min each time. After incubation with the antibody for 1h at room temperature, sections were incubated with biotin-conjugated polyclonal anti-rabbit immunoglobulin antibody followed by the streptavidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, CA) and were then counterstained with hematoxylin (provider, town, country). Negative controls were incubated in buffered solution without primary antibody. Immunohistochemistry was performed on 3- m-thick representative whole tissue sections from 50 cases, which were mounted on polylysine-coated slides. hGSTA1 antibody was used at 1:100. Heat-induced antigen retrieval was employed: 30 min in buffer pH 6.0 in a pre-treatment module (Labvision, Fremont, CA, USA) for hGSTA1 antibody. Sections were blocked with 1.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 10 min and incubated with hGSTA1 antibodies for 60 min at room temperature. Detection was achieved with the Vector avidin-biotin complex (ABC) system (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations, using 3,3'-diaminobenzidine (Dako, Glostrup, Denmark) as a chromogenic substrate. Slides were lightly counterstained with haematoxylin. Positive controls (normal breast section) and negative controls (omission of the primary antibody and substitution of the primary antibody by IgG-matched control) were

included in each experiment. hGSTA1 immunostains obtained with the two antibodies were analyzed independently by four of the authors (MV, SSP, MP and MLT) using the Allred scoring system that combines the staining intensity and the percentage of stained cells (intensity score 0-3 + % score 0-5)(73). The staining intensity was scored as absent (0), weak (1+), moderate (2+) or intense (3+). The percentage of stained tumor cells, as well as the staining localization (cytoplasmic, mitochondrial, and nuclear) was assessed. An immunoreactive score (IRS, ranging from 0 to 12) was calculated by multiplying the staining intensity (0,1,2,3) with the percentage of stained cells scored as follows: <1% stained cells=0, 1-10% stained cells=1, 11-50% stained cells=2, 51-80% stained cells=3, >80% stained cells=4. For each case, the score was assessed separately for the cytoplasmic, nuclear and membrane reactivity. An Allred score of >2 was considered as positive. Immunohistochemical analysis with the hGSTA1 clone was carried out with the observers blinded to the results of the analysis of the HEK23T-hGSTA1 clone. For a comparison with fibromatosis, we considered the expression patterns and levels of  $\beta$ -catenin in the stromal cells of phyllodes tumors and in the most abundant component of metaplastic carcinomas. Data analysis was performed with the results obtained with each antibody and also with combined results (i.e., for nuclear/cytoplasmic staining, positivity was defined as positive for at least one section; for membrane staining, the highest Allred score was taken into account).

**Survival analysis.** Survival analysis of genes was carried out using Kaplan-Meier plotting tool (KMPT) ([www.kmplot.com/breast/](http://www.kmplot.com/breast/)). In KMPT, all the breast cancer datasets available in KMPT webserver are taken, and samples of each dataset are combined as a whole (74). The effect of genes on these samples was checked for OS endpoint. In KMPT, the expression values of individual genes in different samples are grouped into lower and upper quartiles based on median expression value. Logrank test is used to compare these two groups for survival endpoints.

**Patient gene expression analysis.** Normalized patient data were downloaded either from the GEPIA database (for Breast GTEx and TCGA data), or Xenabrowser (Pan-Can TCGA data). TCGA data were stratified at the median by GSTA1 expression and subsequently analyzed.

**Animal studies** The study was approved by the French animal welfare department. All animals were housed and maintained at the CREFRE in Toulouse. The mouse line was established from commercial FVB/N-Tg(MMTV-PyVT)634Mul/J also called PyMTTg mice (75) (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA, #002374). Males PyMTTg were bred with females FVB WT mice to generate the experimental cohort. The core breeding is genotyped as described by Jackson Laboratory. Males PyMTTg and females WT were used to maintain the mouse line. Females PyMTTg are developing spontaneously widespread tumors in the 10 mammary glands along weeks mimicking human breast cancer development from hyperplasia (5-6 weeks) to late carcinoma (12 weeks) (76). After weaning at 3-weeks age, all females PyMTTg are included in experiments and followed up to 12-weeks age. Tumor development for the 10 mammary glands was monitored firstly by palpation from 3 weeks and was measured from 7 weeks to 12 weeks. Tumor volumes is determined using a calliper and calculated as per the formula:  $(width^2 \times length)/2$ .

**Time course experiment.** 5 females PyMTTg were euthanized for every age from 3 weeks to 12 weeks. All mammary glands were excised and weighed. Portions of tumors were conserved in -80 C in RNA later (marque) for RNA analysis, snap frozen for GC and LC-MS analysis or fixed in 10% neutral buffered formalin for IHC.

**DDA treatment experiment.** 8-10 females PyMTTg were randomly distributed in 3 groups. One group as a control group and 2 groups treated with DDA at 5mg/kg by IP or IV. Mice were

treated every day 5 days a week from 3-weeks age to 12-weeks age. At 12-weeks, mice were sacrificed and mammary glands were collected. Portions of tumors were conserved in -80 C in RNA later (Invitrogen) for RNA analysis, snap frozen for GC and LC-MS analysis or fixed in 10% neutral buffered formalin for IHC. Lungs were collected after perfusion with PBS and fixed in 10% neutral buffered formalin for IHC.

**RNA analysis.** Tumoral mammary fad pads (and lungs) tissue were disrupted in trizol CK-14 ceramic beads containing tube with Precellys homogenizers (Bertin). 3 cycles of 30s at 6500rpm were performed with 1 min of pause in ice between each cycle. Total RNA was then extracted using Trizol<sup>TM</sup> manufacturer's protocol (Invitrogen). Due a high content of lipids, total RNA was further purified using DNaseI treatment and NucleoSpin RNA isolation kit from Macherey –Nagel following the clean-up protocol. Total RNA was quantified with the Nanodrop instrument and purity was checked by the ratio Abs 260/280 and 260/230. A high quality of total RNA corresponds to ratios Abs 260/280 and 260/230 >1,7. 1 g of RNA was reverse-transcribed using iScript<sup>TM</sup> cDNA synthesis kit (Biorad). 25ng of cDNA was used to analyse gene expression by SYBR Green (Biorad) - based real-time PCR with Stepone system (Applied Biosystem). Normalized fold change in gene expression in the tumoral fad pad or lung from different ages mouse tissues relative to 5-week age mouse tissues was calculated according Pffalf method and MIQE guidelines (77) using TBP as reference gene. The following primer sequences were used:

Mouse genes	Forward	Reverse
TBP	TCCCCCTCTGCACTGAAATC	AGTGCCGCCCAAGTAGCA
PyMT	CTCCAACAGATACACCCGCACA TAC	GCTGGTCTTGGTCGCTTTCTGGA TAC
HSD11B 2	ACCGGTTGTGACACTGGTTT	TCTAGGGCACCAGGGCTATT
GSTA1	GGAAGGCTTTCAAGATTCAGTG AA	AAATAGCCAGGATCAACAATTG CT
GSTA2	GGAAGGTTTTCAAGTTTTAGTGT G	CAATAGCCAGAATCAACAATTG TA
GSTA3	TGGACAACCTCCCTCTCCTGAA	AATCTTCTTTGCTGACTCAACAC ATT
GSTA4	AGCTCAGTTGGGCAGACATC	AGCACGCTGCACTAGAACTT
D8D7I (EBP)	TTGTCTCTGGGGACCACTCA	TCCCCGTATATCTGGCCCAT
DHCR7	GCCAAGACACCACCTGTGACAG	TGGACGCCTCCACATAACC
LXR�	GAGCAGCGTCCATTGAGAG	GCAGTCAGTGAGCCTTCG
LXR�	AACCTGCCAGATGGATGCCTTC	GCTGCTGCTGTTGCTGCTT

**Metabolites quantification.** Oxysterols quantification by GC-MS was performed according to previously published procedures (78, 79). DDA quantification in mice was performed using UPLC-MS method exactly as previously reported (80). The separation and quantification of DDA was then achieved on UHPLC Ultimate 3000 from Dionex coupled to ABSciex Q-Trap 4500 as reported in SI.

**Lung metastasis.** Mouse lung from 12weeks-age female mice were perfused, excised, fixed in 10% neutral-buffered formalin for 24h and embedded in paraffin after dehydration. Sections were cut at 5 m and stained with hematoxylin and eosin. The number of metastasis were

counted on each slide. The average of metastasis was calculated for the different experimental group.

**Statistical analysis.** Values are the mean  $\pm$  S.E. of three independent experiments each carried out in duplicate. Statistical analysis was carried out using a Student's t-test for unpaired variables; \* and \*\* in the figures refer to statistical probabilities (P) of <0.001 and <0.0001, respectively, compared with control cells that received solvent vehicle alone. Tissues from patients were analyzed for significance and pairing with Wilcoxon signed rank tests. In the figures, \*, \*\* and \*\*\* refer to P<0.05, P<0.01 and P<0.001, respectively, compared with controls (vehicle) unless otherwise specified. All statistical tests were carried out using GraphPad Prism 8.0, Microsoft Excel, GSEA, or ChIPseeker and EdgeR package in R. Statistical tests used described in figure legends. Kaplan–Meier plots were generated and analyzed at <http://kmplot.com/analysis>.

**Acknowledgements:** This work was funded by internal grant from the ‘Institut National de la Sant  et de la Recherche M dicale’ and the ‘Universit  de Toulouse III’, the Fondation de France (R11166BB), the Association pour la Recherche sur le Cancer (PJA 2013 12 00 342), the INCA (PRTK-K15-118, PLBIO-2018-145), the Swedish Cancer Society (CAN2017/580) and the Agence Nationale pour la recherche (DASYNT2, ANR-20-CE11-0005). We thank the charity associations “ELLES” and “J’y V” for their generous support. We thank E Noguer for technical assistance. We thank Dr Lo c Van den Berghe from the Pole Technologique at CRCT for the amplification of plasmids, the production of virions and for his advice for transfection experiments. We thank Pr F. Dalenc, Dr. P. Rochaix and L. Puydenus from the tumor bank of the Institut Claudius Regaud. This paper is dedicated to the memory of Dr Jean-Charles Faye and Dr V. Craig Jordan.

Competing interests: The authors declare no competing financial interests.

## References:

1. C. Ben Hassen *et al.*, Is cholesterol a risk factor for breast cancer incidence and outcome? *J Steroid Biochem Mol Biol* **232**, 106346 (2023).
2. S. Silvente-Poirot, F. Dalenc, M. Poirot, The Effects of Cholesterol-Derived Oncometabolites on Nuclear Receptor Function in Cancer. *Cancer Res* **78**, 4803-4808 (2018).
3. S. Silvente-Poirot, M. Poirot, Cancer. Cholesterol and cancer, in the balance. *Science* **343**, 1445-1446 (2014).
4. P. de Medina *et al.*, Chemical synthesis and biochemical properties of cholestane-5alpha,6beta-diol-3-sulfonate: A non-hydrolysable analogue of cholestane-5alpha,6beta-diol-3beta-sulfate. *J Steroid Biochem Mol Biol* **234**, 106396 (2023).
5. S. Ayadi *et al.*, 27-Hydroxylation of oncosterone by CYP27A1 switches its activity from pro-tumor to anti-tumor. *J Lipid Res* **64**, 100479 (2023).
6. P. de Medina *et al.*, The 5,6-epoxycholesterol metabolic pathway in breast cancer: Emergence of new pharmacological targets. *Br J Pharmacol* **178**, 3248-3260 (2021).
7. P. de Medina *et al.*, The Cholesterol-5,6-Epoxyde Hydrolase: A Metabolic Checkpoint in Several Diseases. *Adv Exp Med Biol* **1440**, 149-161 (2024).



8. M. Poirot, S. Silvente-Poirot, Cholesterol-5,6-epoxides: chemistry, biochemistry, metabolic fate and cancer. *Biochimie* **95**, 622-631 (2013).
9. M. Voisin *et al.*, Identification of a tumor-promoter cholesterol metabolite in human breast cancers acting through the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E9346-E9355 (2017).
10. P. de Medina *et al.*, Dendrogenin A arises from cholesterol and histamine metabolism and shows cell differentiation and anti-tumour properties. *Nat Commun* **4**, 1840 (2013).
11. P. de Medina, J. Bunay, M. Poirot, M. Record, S. Silvente-Poirot, Targeting NR1H/liver X receptor with dendrogenin A differentiates tumor cells to activate a new secretory pathway releasing immunogenic anti-tumor vesicles enriched in LC3-II-associated exosomes. *Autophagy* **19**, 1036-1038 (2023).
12. M. Record *et al.*, Targeting the liver X receptor with dendrogenin A differentiates tumour cells to secrete immunogenic exosome-enriched vesicles. *J Extracell Vesicles* **11**, e12211 (2022).
13. M. Bauriaud-Mallet *et al.*, The cholesterol-derived metabolite dendrogenin A functionally reprograms breast adenocarcinoma and undifferentiated thyroid cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* **192**, 105390 (2019).
14. S. Silvente-Poirot, G. Segala, M. C. Poirot, M. Poirot, Ligand-dependent transcriptional induction of lethal autophagy: A new perspective for cancer treatment. *Autophagy* **14**, 555-557 (2018).
15. M. Poirot, S. Silvente-Poirot, The tumor-suppressor cholesterol metabolite, dendrogenin A, is a new class of LXR modulator activating lethal autophagy in cancers. *Biochem Pharmacol* **153**, 75-81 (2018).
16. G. Segala *et al.*, Dendrogenin A drives LXR to trigger lethal autophagy in cancers. *Nat Commun* **8**, 1903 (2017).
17. S. Silvente-Poirot, P. de Medina, M. Record, M. Poirot, From tamoxifen to dendrogenin A: The discovery of a mammalian tumor suppressor and cholesterol metabolite. *Biochimie* **130**, 109-114 (2016).
18. N. Serhan *et al.*, Dendrogenin A synergizes with Cytarabine to Kill Acute Myeloid Leukemia Cells In Vitro and In Vivo. *Cancers (Basel)* **12**, (2020).
19. P. L. Mouchel *et al.*, Dendrogenin A Enhances Anti-Leukemic Effect of Anthracycline in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)* **12**, (2020).
20. S. A. Khalifa *et al.*, The novel steroidal alkaloids dendrogenin A and B promote proliferation of adult neural stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **446**, 681-686 (2014).
21. P. de Medina, M. R. Paillasse, B. Payre, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, Synthesis of new alkylaminooxysterols with potent cell differentiating activities: identification of leads for the treatment of cancer and neurodegenerative diseases. *J Med Chem* **52**, 7765-7777 (2009).
22. M. R. Paillasse *et al.*, Surprising unreactivity of cholesterol-5,6-epoxides towards nucleophiles. *J Lipid Res* **53**, 718-725 (2012).

23. T. Watabe, T. Sawahata, J. Horie, Evidence for the formation of a steroid S-glutathione conjugate from an epoxysteroid precursor. *Biochem Biophys Res Commun* **87**, 469-475 (1979).
24. D. J. Meyer, B. Ketterer, 5 alpha,6 alpha-Epoxy-cholestan-3 beta-ol (cholesterol alpha-oxide): A specific substrate for rat liver glutathione transferase B. *FEBS Lett* **150**, 499-502 (1982).
25. J. D. Hayes, J. U. Flanagan, I. R. Jowsey, Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **45**, 51-88 (2005).
26. B. Mannervik, U. H. Danielson, Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem* **23**, 283-337 (1988).
27. A. E. Adang *et al.*, Substrate specificity of rat liver glutathione S-transferase isoenzymes for a series of glutathione analogues, modified at the gamma-glutamyl moiety. *Biochem J* **255**, 721-724 (1988).
28. S. Attalla, T. Taifour, T. Bui, W. Muller, Insights from transgenic mouse models of PyMT-induced breast cancer: recapitulating human breast cancer progression in vivo. *Oncogene* **40**, 475-491 (2021).
29. A. Bartha, B. Gyorffy, TNMplot.com: A Web Tool for the Comparison of Gene Expression in Normal, Tumor and Metastatic Tissues. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
30. E. Gadaleta *et al.*, Characterization of four subtypes in morphologically normal tissue excised proximal and distal to breast cancer. *NPJ Breast Cancer* **6**, 38 (2020).
31. B. Gyorffy, Survival analysis across the entire transcriptome identifies biomarkers with the highest prognostic power in breast cancer. *Comput Struct Biotechnol J* **19**, 4101-4109 (2021).
32. J. S. Parker *et al.*, Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* **27**, 1160-1167 (2009).
33. K. Tars, B. Olin, B. Mannervik, Structural basis for featuring of steroid isomerase activity in alpha class glutathione transferases. *J Mol Biol* **397**, 332-340 (2010).
34. A. S. Johansson, B. Mannervik, Active-site residues governing high steroid isomerase activity in human glutathione transferase A3-3. *J Biol Chem* **277**, 16648-16654 (2002).
35. L. M. Balogh *et al.*, Substrate specificity combined with stereopromiscuity in glutathione transferase A4-4-dependent metabolism of 4-hydroxynonenal. *Biochemistry* **49**, 1541-1548 (2010).
36. R. Sharma *et al.*, Transfection with 4-hydroxynonenal-metabolizing glutathione S-transferase isozymes leads to phenotypic transformation and immortalization of adherent cells. *Eur J Biochem* **271**, 1690-1701 (2004).
37. B. Wu, D. Dong, Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* **33**, 656-668 (2012).
38. L. Xu, N. A. Porter, Free radical oxidation of cholesterol and its precursors: Implications in cholesterol biosynthesis disorders. *Free Radic Res* **49**, 835-849 (2015).



39. M. Sohel *et al.*, Exploring the anti-cancer potential of dietary phytochemicals for the patients with breast cancer: A comprehensive review. *Cancer Med* **12**, 14556-14583 (2023).
40. H. Qian, Y. Yang, X. Wang, Curcumin enhanced adriamycin-induced human liver-derived Hepatoma G2 cell death through activation of mitochondria-mediated apoptosis and autophagy. *Eur J Pharm Sci* **43**, 125-131 (2011).
41. L. Masuelli *et al.*, Chloroquine supplementation increases the cytotoxic effect of curcumin against Her2/neu overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo in nude mice while counteracts it in immune competent mice. *Oncoimmunology* **6**, e1356151 (2017).
42. C. Liu, M. Rokavec, Z. Huang, H. Hermeking, Curcumin activates a ROS/KEAP1/NRF2/miR-34a/b/c cascade to suppress colorectal cancer metastasis. *Cell Death Differ* **30**, 1771-1785 (2023).
43. B. Chen *et al.*, Curcumin inhibits proliferation of breast cancer cells through Nrf2-mediated down-regulation of Fen1 expression. *J Steroid Biochem Mol Biol* **143**, 11-18 (2014).
44. V. Brinkmann *et al.*, Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent and -Independent Pathways Mediate Curcumin Anti-Aging Effects. *Antioxidants (Basel)* **11**, (2022).
45. A. Mohammadi-Bardbori, J. Bengtsson, U. Rannug, A. Rannug, E. Wincent, Quercetin, resveratrol, and curcumin are indirect activators of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). *Chem Res Toxicol* **25**, 1878-1884 (2012).
46. A. L. Rinaldi *et al.*, Curcumin activates the aryl hydrocarbon receptor yet significantly inhibits (-)-benzo(a)pyrene-7R-trans-7,8-dihydrodiol bioactivation in oral squamous cell carcinoma cells and oral mucosa. *Cancer Res* **62**, 5451-5456 (2002).
47. T. Ming *et al.*, Curcumin: An epigenetic regulator and its application in cancer. *Biomed Pharmacother* **156**, 113956 (2022).
48. N. Alikhani *et al.*, Mammary tumor growth and pulmonary metastasis are enhanced in a hyperlipidemic mouse model. *Oncogene* **32**, 961-967 (2013).
49. T. H. Qiu *et al.*, Global expression profiling identifies signatures of tumor virulence in MMTV-PyMT-transgenic mice: correlation to human disease. *Cancer Res* **64**, 5973-5981 (2004).
50. G. Llaverias *et al.*, Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer. *Am J Pathol* **178**, 402-412 (2011).
51. A. D. Reed *et al.*, A single-cell atlas enables mapping of homeostatic cellular shifts in the adult human breast. *Nat Genet* **56**, 652-662 (2024).
52. J. L. Reynolds *et al.*, Histamine in human breast cancer. *Br J Surg* **85**, 538-541 (1998).
53. W. J. Griffiths, Y. Wang, Oxysterols as lipid mediators: Their biosynthetic genes, enzymes and metabolites. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **147**, 106381 (2020).
54. R. C. Murphy, K. M. Johnson, Cholesterol, reactive oxygen species, and the formation of biologically active mediators. *J Biol Chem* **283**, 15521-15525 (2008).

55. F. D. Porter *et al.*, Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. *Sci Transl Med* **2**, 56ra81 (2010).
56. S. Boenzi *et al.*, Evaluation of plasma cholestane-3beta,5alpha,6beta-triol and 7-ketocholesterol in inherited disorders related to cholesterol metabolism. *J Lipid Res* **57**, 361-367 (2016).
57. S. Pajares *et al.*, Cholestane-3beta,5alpha,6beta-triol: high levels in Niemann-Pick type C, cerebrotendinous xanthomatosis, and lysosomal acid lipase deficiency. *J Lipid Res* **56**, 1926-1935 (2015).
58. A. N. Dang Do *et al.*, Elevated oxysterol and N-palmitoyl-O-phosphocholineserine levels in congenital disorders of glycosylation. *J Inherit Metab Dis* **46**, 326-334 (2023).
59. T. C. Shea *et al.*, Glutathione transferase activity and isoenzyme composition in primary human breast cancers. *Cancer Res* **50**, 6848-6853 (1990).
60. J. von Mach-Szczypinski, S. Stanosz, K. Sieja, M. Stanosz, Metabolism of histamine in tissues of primary ductal breast cancer. *Metabolism* **58**, 867-870 (2009).
61. J. von Mach-Szczypinski, S. Stanosz, K. Sieja, M. Stanosz, Histamine and its metabolizing enzymes in tissues of primary ductal breast cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* **30**, 509-511 (2009).
62. M. R. Wrensch *et al.*, Breast fluid cholesterol and cholesterol beta-epoxide concentrations in women with benign breast disease. *Cancer Res* **49**, 2168-2174 (1989).
63. K. D. Tew *et al.*, Glutathione-associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute Drug Screening Program. *Mol Pharmacol* **50**, 149-159 (1996).
64. M. Voisin, S. Silvente-Poirot, M. Poirot, One step synthesis of 6-oxo-cholestan-3beta,5alpha-diol. *Biochem Biophys Res Commun* **446**, 782-785 (2014).
65. W. H. Habig *et al.*, The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 3879-3882 (1974).
66. B. I. Eklund, M. Moberg, J. Bergquist, B. Mannervik, Divergent activities of human glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine. *Mol Pharmacol* **70**, 747-754 (2006).
67. C. Vonrhein *et al.*, Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 293-302 (2011).
68. W. Kabsch, Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 125-132 (2010).
69. J. Agirre *et al.*, The CCP4 suite: integrative software for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **79**, 449-461 (2023).
70. G. Bricogne *et al.* (Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd., 2017).
71. G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 240-255 (1997).
72. P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 486-501 (2010).

73. J. M. Harvey, G. M. Clark, C. K. Osborne, D. C. Allred, Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* **17**, 1474-1481 (1999).
74. B. Györfy *et al.*, An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat* **123**, 725-731 (2010).
75. C. T. Guy, R. D. Cardiff, W. J. Muller, Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol* **12**, 954-961 (1992).
76. E. Y. Lin *et al.*, Progression to malignancy in the polyoma middle T oncoprotein mouse breast cancer model provides a reliable model for human diseases. *Am J Pathol* **163**, 2113-2126 (2003).
77. S. A. Bustin *et al.*, The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **55**, 611-622 (2009).
78. R. Soules *et al.*, Improvement of 5,6 $\alpha$ -epoxycholesterol, 5,6 $\beta$ -epoxycholesterol, cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol and 6-oxo-cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol recovery for quantification by GC/MS. *Chem Phys Lipids* **207**, 92-98 (2017).
79. F. Dalenc *et al.*, Circulating oxysterol metabolites as potential new surrogate markers in patients with hormone receptor-positive breast cancer: Results of the OXYTAM study. *J Steroid Biochem Mol Biol* **169**, 210-218 (2017).
80. R. Soules *et al.*, A fast UPLC-HILIC method for an accurate quantification of androgen A in human tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* **194**, 105447 (2019).

## Résultat et discussion

L'utilisation d'approches combinées, nous a permis d'identifier la hGSTA1 comme étant l'enzyme responsable de la biosynthèse de la DDA. 1) l'expression ectopique de la hGSTA1 dans des cellules conduit à la production de la DDA. 2) l'utilisation d'approches génétique et pharmacologique démontrent que la hGSTA1 porte l'activité DDA synthase. 3) L'enzyme recombinante purifiée démontre une activité DDAS. Nos données indiquent que la hGSTA1 est nécessaire et suffisante pour produire la DDA. La hGSTA1 présente une stéréosélectivité pour le 5,6 $\alpha$ -EC par rapport au 5,6 $\beta$ -EC, ce dernier ne subissant pas de conjugaison avec l'histamine par l'enzyme. Nous avons réussi à cristalliser l'enzyme en présence du dérivé biliaire de la DDA, ce qui a permis de démontrer au niveau atomistique l'activité DDAS de la hGSTA1 et de souligner l'importance de la stéréochimie 5(S)-6(R) du produit de conjugaison.

Nos données expérimentales confirment que les diastéréoisomères des 5,6-ECs ont des rôles physiologiques distincts. Le 5,6 $\beta$ -EC et ses métabolites, tels que le CT et l'OCDO, se sont révélés être de puissants inhibiteurs de l'activité de la DDAS. Cela suggère qu'une concentration élevée de ces métabolites dans le contexte des tumeurs mammaires pourrait diminuer la production de DDA, constituant ainsi un mécanisme moléculaire contribuant à la carcinogenèse mammaire. Ces données fournissent une explication possible à l'origine de la diminution des niveaux de DDA observées dans les tumeurs, comme rapporté précédemment (Philippe De Medina et al. 2013). En effet, les taux d'OCDO mesurés dans les tumeurs mammaires augmentent jusqu'à atteindre des concentrations inhibitrices de l'activité DDAS (Voisin et al. 2017). Les analyses par LC-MS de biopsies de tumeurs mammaires ER $\alpha$ + de patients étendues à une cinquantaines d'échantillons par rapport à l'étude initiale réalisée par l'équipe en 2013 (Philippe De Medina et al. 2013) confirment une diminution des taux de DDA dans les tumeurs par rapports aux tissus normaux adjacents. Elle montre également l'expression sélective de la protéine hGSTA1 dans les cellules épithéliales mammaires des canaux lactifères et des lobules mammaires. Cela indique que la production de DDA dans le sein est localisée dans ces cellules. L'étude du modèle murin MMTV-PYMC, qui est un modèle de souris qui développe des tumeurs mammaires spontanément, révèle une dérégulation similaire à celle observée dans les tumeurs mammaires humaines avec une diminution de l'expression de la mGSTA1 parallèle à la diminution des taux de DDA et une augmentation des

enzymes de la voie de biosynthèse de l'OCDO et de l'OCDO dans les tumeurs. Elle montre de plus que l'administration exogène de la DDA ralentit le développement tumoral et bloque l'effusion métastatique démontrant l'importance de la DDA dans le contrôle du processus de la carcinogenèse mammaire.

### Conclusion et perspectives

Cette étude démontre que l'enzyme hGSTA1 possède une activité DDAS, confirmant pour la première fois qu'elle est responsable de la biosynthèse de la DDA. Cela révèle également que la hGSTA1 peut utiliser l'histamine comme substrat, agissant à la fois comme enzyme de glutathionylation et d'histamination, produisant ainsi le métabolite endogène suppresseur de tumeur, la DDA. L'analyse des données transcriptomiques montre qu'une forte expression de GSTA1 dans les tumeurs mammaires est associée à une meilleure survie sans rechute chez les patientes (n=4929, HR=0.75,  $p<0.0001$ , 36 ensembles de données), indiquant que la production de la DDA par la GSTA1, une molécule aux propriétés antitumorales, pourrait contribuer ainsi à cet effet protecteur chez les patientes.

De façon intéressante, nous avons observé que l'expression de la hGSTA1 est limitée aux cellules épithéliales, qui ne représentent que 2 % des cellules de la glande mammaire, ceci est corrélé avec les analyses transcriptomiques en « single cell » sur le site [HPA](#). C'est pourquoi les biopsies sélectionnées pour la quantification de la DDA contenaient au moins 20 % de ces cellules épithéliales. En effet, la DDA est indétectable dans les échantillons où ces cellules épithéliales sont peu présentes. Par ailleurs, bien que la GSTA1 appartienne à la famille des enzymes impliquées dans la détoxification des xénobiotiques (phase II), nos résultats montrent qu'elle participe activement au métabolisme lipidique endogène en produisant un lipide bioactif, à l'instar des époxydes hydrolases avec les eicosanoïdes (Morisseau 2013). Si l'activité DDAS est observée pour la GSTA1 et la GSTA3 (peu exprimée dans le tissu mammaire en ARNm), elle n'a pas été détectée chez les autres enzymes de la classe alpha ni dans d'autres classes de GST. Cette observation, analogue à celle concernant l'activité stéroïde isomérase (Johansson et Mannervik 2001; Pettersson et Mannervik 2001), suggère que seules la GSTA1 et la GSTA3 portent l'activité DDAS.

Nous avons déterminé que plusieurs classes de molécules peuvent inhiber la production de DDA au niveau enzymatique. Parmi celles-ci, des xénobiotiques comme le CDNB, bien que

structurellement hétérogènes, inhibent l'activité DDAS, ce qui pourrait entraîner une carence en DDA et sensibiliser les cellules à des dérives carcinogènes. De plus, certaines classes d'oxystérols, en particulier les ROX (5,6 $\beta$ -EC, CT, OCDO) et leurs dérivés de la série 7-DHC sont des inhibiteurs puissants de l'activité DDAS, ce qui suggère que leur présence peut perturber la production de DDA et entraîner des déséquilibres physiologiques. Il serait donc pertinent d'explorer l'impact de ces inhibitions dans des conditions où la production de ces molécules augmente, comme dans les cas de peroxydation lipidique, les syndromes de Wilson, SLO et NPC1.

Nous avons également étudié le métabolisme des 5,6-ECs dans un modèle de souris transgéniques développant spontanément des tumeurs mammaires, modèle qui reflète fidèlement la pathologie humaine, et dans lequel, une alimentation riche en stérols favorise le développement tumoral (Llaverias et al. 2011). Nous avons mis en évidence que, durant la carcinogenèse, une dérégulation du métabolisme des 5,6-ECs similaire à celle observée chez l'humain peut être compensée par un apport exogène de DDA, ralentissant ainsi la progression tumorale et bloquant l'effusion métastatique pulmonaire. Ce modèle est donc particulièrement adapté pour rechercher des modulateurs de ce métabolisme afin d'identifier à la fois des composés anticancéreux et des agents carcinogènes.

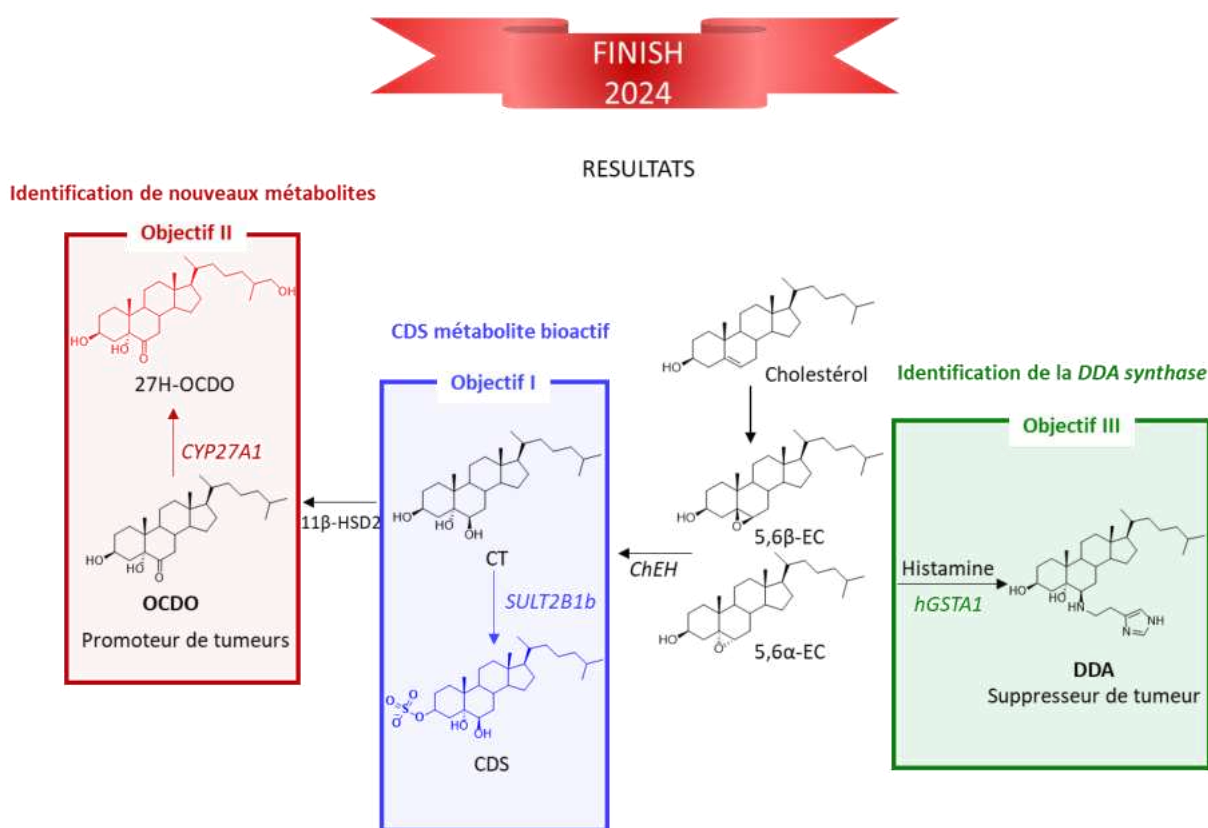
La GSTA1 humaine présente une activité DDAS, mais nous avons également observé qu'elle possède une activité de glutathionylation du 5,6 $\alpha$ -EC, similaire à la rGSTA1, conduisant à la production de DDC. Nous avons observé que les conditions nécessaires à la production de la DDC diffèrent de celles requises pour la DDA et sont mutuellement exclusives (données non montrées). Il est donc probable que la production sélective de l'un ou l'autre des conjugués dépende de la localisation subcellulaire de la hGSTA1. De plus, nous avons pu observer que la DDC est un lipide bioactif avec des propriétés biologiques distinctes de celles de la DDA (données non montrées). Cette molécule fait actuellement l'objet d'un programme d'étude approfondi au sein de notre équipe, car nous avons également démontré son existence en tant que métabolite chez l'homme et la souris (données non montrées).

Dans le cadre du programme financé par l'ANR (DASYNT2, ANR-20-CE11-005), en plus des projets précédemment présentés, l'un des objectifs était de synthétiser une large gamme de conjugués de 5,6 $\alpha$ -EC avec des composés nucléophiles biogènes, tels que des amines et des

mercaptans. Nous avons ainsi réalisé la synthèse, la purification et la caractérisation d'une vingtaine de nouveaux conjugués, notamment avec des neurotransmetteurs. Ces molécules ont servi de standards pour établir les conditions analytiques en LC-MS, et nous avons déjà démontré l'existence d'une dizaine d'entre elles comme métabolites chez les mammifères. De plus, chacune de ces molécules a montré une activité bioactive lors de tests sur cellules, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour explorer leurs potentiels rôles physiologiques (données non montrées).



## Conclusion et perspectives générales



Le projet mené au cours de cette thèse à l'interface chimie-biologie nous a permis de développer de nombreuses molécules chimiques nécessaires à la compréhension de phénomènes biologiques et à l'identification de l'enzyme responsable de la biosynthèse de DDA dans la glande mammaire. Les études menées ont davantage révélé l'importance biologique de la voie métabolique des 5,6-ECs. Nous avons synthétisé et caractérisé le cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -sulfonate (CDSN), un analogue non hydrolysable du métabolite cholestane-5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diol-3 $\beta$ -sulfate (CDS). Nous avons démontré que le CDSN est biologiquement actif, indiquant que la sulfatation des stérols ne se limite pas à leur élimination ou inactivation. Ainsi, le CDSN constitue une approche prometteuse pour explorer les propriétés biologiques du CDS et par conséquent mieux comprendre le rôle physiopathologique du CT, un marqueur sérique de la maladie de Niemann-Pick C1 et précurseur direct du CDS.

Le cholestérol peut subir divers types de métabolismes, et nous avons étudié le cas de l'OCDO, un ROX, en nous intéressant à son métabolisme par l'enzyme CYP27A1, responsable de

l'hydroxylation en C27 sur la chaîne latérale. Grâce à la synthèse chimique des formes hydroxylées en C27 de l'OCDO et de ses précurseurs, nous avons pu obtenir des standards pour étudier l'éventualité de l'existence d'un tel métabolisme. En parallèle, nous avons également synthétisé des dérivés hydroxylés en C25 afin de disposer de régioisomère de ces composés hydroxylés en C27. Nous avons pu montrer que l'OCDO et ses précurseurs subissent un métabolisme actif via le CYP27A1, conduisant à la formation de dérivés hydroxylés en C27. Ce travail a permis de mettre en évidence que le dérivé 27H-OCDO non seulement inactive les propriétés pro-tumorales de l'OCDO et celle du 27-HC, mais également qu'il possède des propriétés antiprolifératives, révélant une boucle de régulation entre ces deux promoteurs de tumeurs l'OCDO et le 27-HC.

Compte tenu de l'importance des propriétés biologiques de ces molécules, leur production fournira des standards précieux pour la communauté scientifique, permettant une meilleure compréhension de leur rôle dans la carcinogenèse mammaire et d'autres pathologies. Ainsi, un rôle biologique potentiel peut être envisagé pour les dérivés hydroxylés en C25, 24(S), 22(R) et 20(S) des ROX, y compris l'OCDO et ses précurseurs. La synthèse de ces composés ouvre la voie à des projets de recherche futurs.

En parallèle, nous avons identifié la glutathion S-transférase humaine (hGSTA1) comme l'enzyme responsable de la biosynthèse de la Dendrogenine A (DDA) *in vivo* à partir du 5,6 $\alpha$ -EC chez l'homme, révélant une nouvelle branche dans la voie du cholestérol menant à un suppresseur de tumeur. Nous avons observé une dérégulation du métabolisme de la DDA dans les cancers du sein, principalement causée par une déficience en DDAS (hGSTA1). Cette dérégulation entraîne un déséquilibre de la balance DDA/OCDO en faveur de l'OCDO, en raison de la perte d'expression de hGSTA1, associée à une diminution des niveaux de DDA et à une augmentation de l'expression de l'enzyme 11 $\beta$ -HSD2, ce qui conduit à des taux accrus d'OCDO. L'accumulation d'OCDO exerce à son tour une inhibition sur la hGSTA1, renforçant ainsi la boucle de dérégulation.

Nous disposons d'un modèle de cancer du sein avec le modèle transgénique MMTV-PyMT, qui est un modèle connu pour mimer la pathologie humaine et qui dans cette étude récapitule cette dérégulation métabolique observée dans la pathologie humaine. Ce modèle constitue un bon choix pour des études précliniques visant à développer des modulateurs ciblant cette

voie. Enfin, nous avons entamé un travail d'identification de nouveaux métabolites bioactifs issus de cette branche métabolique, qui feront l'objet de futurs développements au sein de l'équipe INOV du CRCT.

## Références

1. Ačimovič, Jure, et Damjana Rozman. 2013. « Steroidal Triterpenes of Cholesterol Synthesis ». *Molecules* 18 (4): 4002-17. <https://doi.org/10.3390/molecules18044002>.
2. Acton, Susan, Attilio Rigotti, Katherine T. Landschulz, Shangzhe Xu, Helen H. Hobbs, et Monty Krieger. 1996. « Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor ». *Science* 271 (5248): 518-20. <https://doi.org/10.1126/science.271.5248.518>.
3. Aksoy, I. A., D. M. Otterness, et R. M. Weinshilboum. 1993. « Cholesterol Sulfation in Human Liver. Catalysis by Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase ». *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 21 (2): 268-76.
4. Albers, Michael, Beatrix Blume, Thomas Schlueter, Matthew B. Wright, Ingo Kober, Claus Kremoser, Ulrich Deuschle, et Manfred Koegl. 2006. « A Novel Principle for Partial Agonism of Liver X Receptor Ligands ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (8): 4920-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510101200>.
5. Alberti, S., G. Schuster, P. Parini, D. Feltkamp, U. Diczfalusy, M. Rudling, B. Angelin, I. Björkhem, S. Pettersson, et J. Gustafsson. 2001. « Hepatic Cholesterol Metabolism and Resistance to Dietary Cholesterol in LXR $\beta$ -Deficient Mice ». *Journal of Clinical Investigation* 107 (5): 565-73. <https://doi.org/10.1172/JCI9794>.
6. Alberti, Siegfried, Knut Rune Steffensen, et Jan-Åke Gustafsson. 2000. « Structural Characterisation of the Mouse Nuclear Oxysterol Receptor Genes LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  ». *Gene* 243 (1-2): 93-103. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00555-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00555-7).
7. Altmann, Scott W., Harry R. Davis, Li-ji Zhu, Xiaorui Yao, Lizbeth M. Hoos, Glen Tetzloff, Sai Prasad N. Iyer, et al. 2004. « Niemann-Pick C1 Like 1 Protein Is Critical for Intestinal Cholesterol Absorption ». *Science* 303 (5661): 1201-4. <https://doi.org/10.1126/science.1093131>.
8. Alvarez-Builla, J; Vaquero, J J; Barluenga, J. 2011. *Modern Heterocyclic Chemistry, 1st ed.* Weinheim: Wiley-VCH. <https://doi.org/10.1002/9783527637737>.
9. Anderson, William F., Nilanjan Chatterjee, William B. Ershler, et Otis W. Brawley. 2002. « Estrogen Receptor Breast Cancer Phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results Database ». *Breast Cancer Research and Treatment* 76 (1): 27-36. <https://doi.org/10.1023/A:1020299707510>.
10. Andersson, S, D L Davis, H Dahlbäck, H Jörnvall, et D W Russell. 1989. « Cloning, Structure, and Expression of the Mitochondrial Cytochrome P-450 Sterol 26-Hydroxylase, a Bile Acid Biosynthetic Enzyme ». *Journal of Biological Chemistry* 264 (14): 8222-29. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83172-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83172-6).
11. Ansari, G. A. S., et Leland L. Smith. 1979. « THE OXIDATION OF CHOLESTEROL BY HYDROXYL RADICAL ». *Photochemistry and Photobiology* 30 (1): 147-50. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1979.tb07127.x>.
12. Apfel, Rainer, Doris Benbrook, Gilles Salbert, et Arm MAGNUS Pfahl. 1994. « A Novel Orphan Receptor Specific for a Subset of Thyroid Hormone-Responsive Elements and Its Interaction with the Retinoid/Thyroid Hormone Receptor Subfamily ». *MOL. CELL. BIOL.* 14. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.10.7025-7035.1994>.
13. Aravindhan, Karpagam, Christine L. Webb, Michael Jaye, Avijit Ghosh, Robert N. Willette, N. John DiNardo, et Beat M. Jucker. 2006. « Assessing the Effects of LXR Agonists on Cellular Cholesterol Handling: A Stable Isotope Tracer Study ». *Journal of Lipid Research* 47 (6): 1250-60. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500512-JLR200>.
14. Arenas, Fabian, Carmen Garcia-Ruiz, et Jose C. Fernandez-Checa. 2017. « Intracellular Cholesterol Trafficking and Impact in Neurodegeneration ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10 (novembre):382. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00382>.
15. Aringer, Leif, et Peter Eneroth. 1974. « Formation and Metabolism in Vitro of 5,6-Epoxides of Cholesterol and  $\beta$ -Sitosterol ». *Journal of Lipid Research* 15 (4): 389-98. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)36787-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)36787-0).
16. Armstrong, Richard N. 1991. « Glutathione S-transferases: reaction mechanism, structure, and function ». *Chemical Research in Toxicology* 4 (2): 131-40. <https://doi.org/10.1021/tx00020a001>.
17. Armstrong, R.N. 1994a. « Glutathione S-Transferases: Structure and Mechanism of an Archetypical Detoxication Enzyme ». In *Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology*, édité par Alton Meister, 1<sup>re</sup> éd., 69:1-44. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470123157.ch1>.

18. Armstrong, R.N. 1994b. « Glutathione S-Transferases: Structure and Mechanism of an Archetypical Detoxication Enzyme ». In *Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology*, édité par Alton Meister, 1<sup>re</sup> éd., 69:1-44. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470123157.ch1>.
19. Armstrong, R.N. 1997. « Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases ». *Chemical Research in Toxicology* 10 (1): 2-18. <https://doi.org/10.1021/tx960072x>.
20. Armstrong, R.N., W. Levin, et D.M. Jerina. 1980. « Hepatic Microsomal Epoxide Hydrolase. Mechanistic Studies of the Hydration of K-Region Arene Oxides. » *Journal of Biological Chemistry* 255 (10): 4698-4705. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)85551-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)85551-5).
21. Ashurst, Stephen W., et Gerald M. Cohen. 1980. « A Benzo[a]Pyrene -7,8-Dihydrodiol-9,10-Epoxy Is the Major Metabolite Involved in the Binding of Benzo[a]Pyrene to DNA in Isolated Viable Rat Hepatocytes ». *Chemico-Biological Interactions* 29 (1): 117-27. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(80\)90091-5](https://doi.org/10.1016/0009-2797(80)90091-5).
22. Aström, Anders, Maria Eriksson, Lennart C. Eriksson, Winnie Birberg, Åke Pilotti, et Joseph W. DePierre. 1986. « Subcellular and Organ Distribution of Cholesterol Epoxide Hydrolase in the Rat ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 882 (3): 359-66. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(86\)90259-X](https://doi.org/10.1016/0304-4165(86)90259-X).
23. Atsuta, Y, et K Okuda. 1981. « On the Stereospecificity of Cholestanetriol 26-Monooxygenase. » *Journal of Biological Chemistry* 256 (17): 9144-46. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52520-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52520-0).
24. Axarli, Irine, Abdi W. Muleta, Evangelia G. Chronopoulou, Anastassios C. Papageorgiou, et Nikolaos E. Labrou. 2017. « Directed Evolution of Glutathione Transferases towards a Selective Glutathione-Binding Site and Improved Oxidative Stability ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1861 (1): 3416-28. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.09.004>.
25. Babiker, Amir, Olof Andersson, Erik Lund, Rui-Juan Xiu, Samir Deeb, Ayeleth Reshef, Eran Leitersdorf, Ulf Diczfalussy, et Ingemar Björkhem. 1997. « Elimination of Cholesterol in Macrophages and Endothelial Cells by the Sterol 27-Hydroxylase Mechanism ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (42): 26253-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.42.26253>.
26. Babiker, Amir, et Ulf Diczfalussy. 1998. « Transport of Side-Chain Oxidized Oxysterols in the Human Circulation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1392 (2-3): 333-39. [https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(98\)00047-2](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(98)00047-2).
27. Bach, Robert D., Philippe Y. Ayala, et H. B. Schlegel. 1996. « A Reassessment of the Bond Dissociation Energies of Peroxides. An *Ab Initio* Study ». *Journal of the American Chemical Society* 118 (50): 12758-65. <https://doi.org/10.1021/ja961838i>.
28. Bae, Soo-Han, et Young-Ki Paik. 1997. « Cholesterol Biosynthesis from Lanosterol: Development of a Novel Assay Method and Characterization of Rat Liver Microsomal Lanosterol  $\Delta$ 24-Reductase ». *Biochemical Journal* 326 (2): 609-16. <https://doi.org/10.1042/bj3260609>.
29. Batta, A K, G S Tint, S Shefer, D Abuelo, et G Salen. 1995. « Identification of 8-Dehydrocholesterol (Cholesta-5,8-Dien-3 Beta-Ol) in Patients with Smith-Lemli-Opitz Syndrome. » *Journal of Lipid Research* 36 (4): 705-13. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)40056-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)40056-2).
30. Bauman, David R., Andrew D. Bitmansour, Jeffrey G. McDonald, Bonne M. Thompson, Guosheng Liang, et David W. Russell. 2009. « 25-Hydroxycholesterol Secreted by Macrophages in Response to Toll-like Receptor Activation Suppresses Immunoglobulin A Production ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (39): 16764-69. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909142106>.
31. Bayoumy, K. el-, B. Y. Ji, P. Upadhyaya, Y. H. Chae, C. Kurtzke, A. Rivenson, B. S. Reddy, S. Amin, et S. S. Hecht. 1996. « Lack of Tumorigenicity of Cholesterol Epoxides and Estrone-3,4-Quinone in the Rat Mammary Gland ». *Cancer Research* 56 (9): 1970-73.
32. Bayr, Hülya. 2005. « Reactive Oxygen Species ». *Critical Care Medicine* 33 (Suppl): S498-501. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000186787.64500.12>.
33. Beck, Katharina R., Silvia G. Inderbinen, Sharavan Kanagaratnam, Denise V. Kratschmar, Anton M. Jetten, Hideaki Yamaguchi, et Alex Odermatt. 2019. « 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases Control Access of 7 $\beta$ ,27-Dihydroxycholesterol to Retinoid-Related Orphan Receptor  $\gamma$  ». *Journal of Lipid Research* 60 (9): 1535-46. <https://doi.org/10.1194/jlr.M092908>.

34. Beck, Katharina R., Sharavan Kanagaratnam, Denise V. Kratschmar, Julia Birk, Hideaki Yamaguchi, Andreas W. Sailer, Klaus Seuwen, et Alex Odermatt. 2019. « Enzymatic Interconversion of the Oxysterols 7 $\beta$ ,25-Dihydroxycholesterol and 7-Keto,25-Hydroxycholesterol by 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 and 2 ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 190 (juin):19-28. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.03.011>.
35. Beckwith, Athelstan L J, Ian G E Davison, Allan Maccoll, et Margaret H Mruzek. 1989. « The Mechanisms of the Rearrangements of Allylic Hydroperoxides: 5 $\alpha$ -Hydro- Peroxy-3 $\beta$ - Hydroxycholest-6-Ene and 7 $\alpha$ -Hydroperoxy-3 $\beta$ -Hydroxycholest-5-Ene ». *J. chem. soc. perkin trans.*
36. Beletskaya, Irina P., et Valentine G. Nenajdenko. 2019. « Towards the 150th Anniversary of the Markovnikov Rule ». *Angewandte Chemie* 131 (15): 4828-39. <https://doi.org/10.1002/ange.201810035>.
37. Benned-Jensen, Tau, Christoffer Norn, Stephane Laurent, Christian M. Madsen, Hjalte M. Larsen, Kristine N. Arfelt, Romain M. Wolf, Thomas Frimurer, Andreas W. Sailer, et Mette M. Rosenkilde. 2012. « Molecular Characterization of Oxysterol Binding to the Epstein-Barr Virus-Induced Gene 2 (GPR183) ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (42): 35470-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.387894>.
38. Berge, Knut E., Hui Tian, Gregory A. Graf, Liqing Yu, Nick V. Grishin, Joshua Schultz, Peter Kwiterovich, Bei Shan, Robert Barnes, et Helen H. Hobbs. 2000. « Accumulation of Dietary Cholesterol in Sitosterolemia Caused by Mutations in Adjacent ABC Transporters ». *Science* 290 (5497): 1771-75. <https://doi.org/10.1126/science.290.5497.1771>.
39. Berrodin, Thomas J., Qi Shen, Elaine M. Quinet, Matthew R. Yudt, Leonard P. Freedman, et Sunil Nagpal. 2010. « Identification of 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoxycholesterol as a Novel Modulator of Liver X Receptor Activity ». *Molecular Pharmacology* 78 (6): 1046-58. <https://doi.org/10.1124/mol.110.065193>.
40. Berséus, Olle, Göran Löfroth, Gunnar Widmark, P. H. Nielsen, Berndt Sjöberg, et Erik Larsen. 1965. « On the Stereospecificity of 26-Hydroxylation of Cholesterol. Bile Acid and Steroids 155. » *Acta Chemica Scandinavica* 19:325-28. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.19-0325>.
41. Biason-Lauber, Anna, et Mariarosaria Lang-Muritano. 2022. « Estrogens: Two Nuclear Receptors, Multiple Possibilities ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 554 (août):111710. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2022.111710>.
42. Bischoff, Fritz. 1969. « Carcinogenic Effects of Steroids ». In *Advances in Lipid Research*, 7:165-244. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-024907-7.50011-7>.
43. Björkhem, Ingemar, Ulf Diczfalusy, Anita Lövgren-Sandblom, Lena Starck, Monica Jonsson, Keri Tallman, Henrik Schirmer, et al. 2014. « On the Formation of 7-Ketocholesterol from 7-Dehydrocholesterol in Patients with CTX and SLO ». *Journal of Lipid Research* 55 (6): 1165-72. <https://doi.org/10.1194/jlr.P048603>.
44. Björkhem, Ingemar, et Gösta Eggertsen. 2001. « Genes Involved in Initial Steps of Bile Acid Synthesis ». *Current Opinion in Lipidology* 12 (2): 97-103. <https://doi.org/10.1097/00041433-200104000-00002>.
45. Björkhem, Ingemar, et Jan Gustafsson. 1973. «  $\omega$ -Hydroxylation of Steroid Side-Chain in Biosynthesis of Bile Acids ». *European Journal of Biochemistry* 36 (1): 201-12. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb02902.x>.
46. Björkhem, Ingemar, et Jan Gustafsson. 1974. « Mitochondrial W-Hydroxylation of Cholesterol Side Chain ». *Journal of Biological Chemistry* 249 (8): 2528-35. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42762-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42762-2).
47. Björkhem, Ingemar, Dieter Lütjohann, Ulf Diczfalusy, Lars Stähle, Gunvor Ahlborg, et John Wahren. 1998. « Cholesterol Homeostasis in Human Brain: Turnover of 24S-Hydroxycholesterol and Evidence for a Cerebral Origin of Most of This Oxysterol in the Circulation ». *Journal of Lipid Research* 39 (8): 1594-1600. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32188-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32188-X).
48. Björkhem, Ingemar, et Steve Meaney. 2004. « Brain Cholesterol: Long Secret Life Behind a Barrier ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (5): 806-15. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000120374.59826.1b>.
49. Black, Homer S., et Wan-Bang Lo. 1971. « Formation of a Carcinogen in Human Skin Irradiated with Ultraviolet Light ». *Nature* 234 (5327): 306-8. <https://doi.org/10.1038/234306a0>.



50. Blassberg, Robert, James I. Macrae, James Briscoe, et John Jacob. 2016. « Reduced Cholesterol Levels Impair Smoothed Activation in Smith–Lemli–Opitz Syndrome ». *Human Molecular Genetics* 25 (4): 693-705. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv507>.
51. Bloch, Konrad. 1965. « The Biological Synthesis of Cholesterol ». *Science* 150 (3692): 19-28. <https://doi.org/10.1126/science.150.3692.19>.
52. Bodin, Karl, Lionel Bretillon, Yacoub Aden, Leif Bertilsson, Ulrika Broomé, Curt Einarsson, et Ulf Diczfalusy. 2001. « Antiepileptic Drugs Increase Plasma Levels of 4 $\beta$ -Hydroxycholesterol in Humans ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (42): 38685-89. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105127200>.
53. Bodo, Bernard. 2015. « De la substance à la structure », La saga du cholestérol, n° 399.
54. Booth, J., E. Boyland, et P. Sims. 1961. « An Enzyme from Rat Liver Catalysing Conjugations with Glutathione ». *Biochemical Journal* 79 (3): 516-24. <https://doi.org/10.1042/bj0790516>.
55. Bösiinger, S., W. Luf, et E. Brandl. 1993. « 'Oxysterols': Their Occurrence and Biological Effects ». *International Dairy Journal* 3 (1): 1-33. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(93\)90073-9](https://doi.org/10.1016/0958-6946(93)90073-9).
56. Boyer, Thomas D. 1989. « Special Article the Glutathione S-Transferases: An Update ». *Hepatology* 9 (3): 486-96. <https://doi.org/10.1002/hep.1840090324>.
57. Brandes, Lorne J. 1984. « A Diphenylmethane Derivative Selective for the Anti-Estrogen Binding Site May Help Define Its Biological Role ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 124 (1): 244-49. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90943-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)90943-4).
58. Brandes, Lorne J., et R. Patricia Bogdanovic. 1986. « New Evidence That the Antiestrogen Binding Site May Be a Novel Growth-Promoting Histamine Receptor (?H3) Which Mediates the Antiestrogenic and Antiproliferative Effects of Tamoxifen ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 134 (2): 601-8. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(86\)80462-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(86)80462-4).
59. Brandes, Lorne J., Linda M. Macdonald, et R. Patricia Bogdanovic. 1985. « Evidence That the Antiestrogen Binding Site Is a Histamine or Histamine-like Receptor ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 126 (2): 905-10. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(85\)90271-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(85)90271-2).
60. Braverman, Nancy, Paul Lin, Fabian F. Moebius, Cassandra Obie, Ann Moser, Hartmut Glossmann, William R. Wilcox, et al. 1999. « Mutations in the Gene Encoding 3 $\beta$ -Hydroxysteroid- $\Delta$ 8, $\Delta$ 7-Isomerase Cause X-Linked Dominant Conradi-Hünemann Syndrome ». *Nature Genetics* 22 (3): 291-94. <https://doi.org/10.1038/10357>.
61. Breuer, Olof, Susanna Dzeletovic, Erik Lund, et Ulf Diczfalusy. 1996. « The Oxysterols Cholest-5-Ene-3 $\beta$ ,4 $\alpha$ -Diol, Cholest-5-Ene-3 $\beta$ ,4 $\beta$ -Diol and Cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Triol Are Formed during in Vitro Oxidation of Low Density Lipoprotein, and Are Present in Human Atherosclerotic Plaques ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1302 (2): 145-52. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(96\)00052-5](https://doi.org/10.1016/0005-2760(96)00052-5).
62. Brinkhorst, Johan, Susheel J. Nara, et Derek A. Pratt. 2008. « Hock Cleavage of Cholesterol 5 $\alpha$ -Hydroperoxide: An Ozone-Free Pathway to the Cholesterol Ozonolysis Products Identified in Arterial Plaque and Brain Tissue ». *Journal of the American Chemical Society* 130 (37): 12224-25. <https://doi.org/10.1021/ja804162d>.
63. Brown, Andrew J, et Wendy Jessup. 1999. « Oxysterols and Atherosclerosis ». *Atherosclerosis* 142 (1): 1-28. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(98\)00196-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(98)00196-8).
64. Brown, Andrew J., et Wendy Jessup. 2009. « Oxysterols: Sources, Cellular Storage and Metabolism, and New Insights into Their Roles in Cholesterol Homeostasis ». *Molecular Aspects of Medicine* 30 (3): 111-22. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.005>.
65. Brown, Andrew J., Laura J. Sharpe, et Michael J. Rogers. 2021. « Oxysterols: From Physiological Tuners to Pharmacological Opportunities ». *British Journal of Pharmacology* 178 (16): 3089-3103. <https://doi.org/10.1111/bph.15073>.
66. Brown, Andrew J., Gerald F. Watts, John R. Burnett, Roger T. Dean, et Wendy Jessup. 2000. « Sterol 27-Hydroxylase Acts on 7-Ketocholesterol in Human Atherosclerotic Lesions and Macrophages in Culture ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (36): 27627-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004060200>.
67. Buñay, Julio, Allan Fouache, Amalia Trousson, Cyrille De Joussineau, Erwan Bouchareb, Zhekun Zhu, Ayhan Kocer, Laurent Morel, Silvere Baron, et Jean-Marc A. Lobaccaro. 2021. « Screening for Liver X Receptor



- Modulators: Where Are We and for What Use? » *British Journal of Pharmacology* 178 (16): 3277-93. <https://doi.org/10.1111/bph.15286>.
68. Burkard, Ines, Katharina M. Rentsch, et Arnold Von Eckardstein. 2004. « Determination of 24S- and 27-Hydroxycholesterol in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry ». *Journal of Lipid Research* 45 (4): 776-81. <https://doi.org/10.1194/jlr.D300036-JLR200>.
  69. Cali, J J, C L Hsieh, U Francke, et D W Russell. 1991. « Mutations in the Bile Acid Biosynthetic Enzyme Sterol 27-Hydroxylase Underlie Cerebrotendinous Xanthomatosis. » *Journal of Biological Chemistry* 266 (12): 7779-83. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)89518-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)89518-0).
  70. Cali, J J, et D W Russell. 1991. « Characterization of Human Sterol 27-Hydroxylase. A Mitochondrial Cytochrome P-450 That Catalyzes Multiple Oxidation Reaction in Bile Acid Biosynthesis. » *Journal of Biological Chemistry* 266 (12): 7774-78. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)89517-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)89517-9).
  71. Cerqueira, Nuno M. F. S. A., Eduardo F. Oliveira, Diana S. Gesto, Diogo Santos-Martins, Cátia Moreira, Hari N. Moorthy, Maria J. Ramos, et P. A. Fernandes. 2016. « Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview ». *Biochemistry* 55 (39): 5483-5506. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00342>.
  72. Chacos, N., J. Capdevila, J.R. Falck, S. Manna, C. Martin-Wixtrom, S.S. Gill, B.D. Hammock, et R.W. Estabrook. 1983. « The Reaction of Arachidonic Acid Epoxides (Epoxyeicosatrienoic Acids) with a Cytosolic Epoxide Hydrolase ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 223 (2): 639-48. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(83\)90628-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90628-8).
  73. Chan, Jarvis T., et Homer S. Black. 1974. « Skin Carcinogenesis: Cholesterol-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoxide Hydrase Activity in Mouse Skin Irradiated with Ultraviolet Light ». *Science* 186 (4170): 1216-17. <https://doi.org/10.1126/science.186.4170.1216>.
  74. Chan, Yen-Ming, Louise S Merkens, William E Connor, Jean-Baptiste Rouillet, Jennifer A Penfield, Julia M Jordan, Robert D Steiner, et Peter J H Jones. 2009. « Effects of Dietary Cholesterol and Simvastatin on Cholesterol Synthesis in Smith-Lemli-Opitz Syndrome ». *Pediatric Research* 65 (6): 681-85. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819ea4eb>.
  75. Chang, Catherine, Ruhong Dong, Akira Miyazaki, Naomi Sakashita, Yi Zhang, Jay Liu, Michael Guo, Bo-Liang Li, et Ta-Yuan Chang. 2006. « Human Acyl-CoA:Cholesterol Acyltransferase (ACAT) and Its Potential as a Target for Pharmaceutical Intervention against Atherosclerosis ». *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 38 (3): 151-56. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2006.00154.x>.
  76. Chang, Ta-Yuan, Catherine C.Y. Chang, Nobutaka Ohgami, et Yoshio Yamauchi. 2006. « Cholesterol Sensing, Trafficking, and Esterification ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22 (1): 129-57. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104656>.
  77. Chao, Esther Y., Justin A. Caravella, Mike A. Watson, Nino Campobasso, Serena Ghisletti, Andrew N. Billin, Cristin Galardi, et al. 2008. « Structure-Guided Design of *N* -Phenyl Tertiary Amines as Transrepression-Selective Liver X Receptor Modulators with Anti-Inflammatory Activity ». *Journal of Medicinal Chemistry* 51 (18): 5758-65. <https://doi.org/10.1021/jm800612u>.
  78. Chatterjee, Anupam, et Sanjay Gupta. 2018. « The Multifaceted Role of Glutathione S-Transferases in Cancer ». *Cancer Letters* 433 (octobre):33-42. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.06.028>.
  79. Chen, J. Don, et Ronald M. Evans. 1995. « A Transcriptional Co-Repressor That Interacts with Nuclear Hormone Receptors ». *Nature* 377 (6548): 454-57. <https://doi.org/10.1038/377454a0>.
  80. Chen, Jean Y., Beatriz Levy-Wilson, Sheryl Goodart, et Allen D. Cooper. 2002. « Mice Expressing the Human CYP7A1 Gene in the Mouse CYP7A1 Knock-out Background Lack Induction of CYP7A1 Expression by Cholesterol Feeding and Have Increased Hypercholesterolemia When Fed a High Fat Diet ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (45): 42588-95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205117200>.
  81. Chen, Jiayi, Jieping Zhang, Lijuan Cai, Li Guo, Zhenyu Cai, Hua Han, et Wen Zhang. 2024. « Cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -Triol Induces Multiple Cell Death in A549 Cells via ER Stress and Autophagy Activation ». *Marine Drugs* 22 (4): 174. <https://doi.org/10.3390/md22040174>.
  82. Cheng, Xiang, Jianying Li, et Deliang Guo. 2018. « SCAP/SREBPs Are Central Players in Lipid Metabolism and Novel Metabolic Targets in Cancer Therapy ». *Current Topics in Medicinal Chemistry* 18 (6): 484-93. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180523104541>.

83. Cheng, Y.W., J.J. Kang, Y.L. Shih, Y.L. Lo, et C.F. Wang. 2005. « Cholesterol-3-Beta, 5-Alpha, 6-Beta-Triol Induced Genotoxicity through Reactive Oxygen Species Formation ». *Food and Chemical Toxicology* 43 (4): 617-22. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.01.007>.
84. Chiang, John Y.L. 2009. « Bile Acids: Regulation of Synthesis ». *Journal of Lipid Research* 50 (10): 1955-66. <https://doi.org/10.1194/jlr.R900010-JLR200>.
85. Chiang, John Y.L., Rhonda Kimmel, et Diane Stroup. 2001. « Regulation of Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase Gene ( CYP7A1 ) Transcription by the Liver Orphan Receptor (LXR $\alpha$ ) ». *Gene* 262 (1-2): 257-65. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00518-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00518-7).
86. Cho, Hyun-Soo, Karen Mason, Kasra X. Ramyar, Ann Marie Stanley, Sandra B. Gabelli, Dan W. Denney, et Daniel J. Leahy. 2003. « Structure of the Extracellular Region of HER2 Alone and in Complex with the Herceptin Fab ». *Nature* 421 (6924): 756-60. <https://doi.org/10.1038/nature01392>.
87. Civra, Andrea, Valeria Cagno, Manuela Donalisio, Fiorella Biasi, Gabriella Leonarduzzi, Giuseppe Poli, et David Lembo. 2014. « Inhibition of Pathogenic Non-Enveloped Viruses by 25-Hydroxycholesterol and 27-Hydroxycholesterol ». *Scientific Reports* 4 (1): 7487. <https://doi.org/10.1038/srep07487>.
88. Clark, A. G., J. N. Smith, et T. W. Speir. 1973. « Cross-Specificity in Some Vertebrate and Insect Glutathione-Transferases with Methyl Parathion (Dimethyl *p* -Nitrophenyl Phosphorothionate), 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene and *S* -Crotonyl- *N* -Acetylcysteamine as Substrates ». *Biochemical Journal* 135 (3): 385-92. <https://doi.org/10.1042/bj1350385>.
89. Clottu, Aurélie S., Amandine Mathias, Andreas W. Sailer, Myriam Schluep, Jörg D. Seebach, Renaud Du Pasquier, et Caroline Pot. 2017. « EB12 Expression and Function: Robust in Memory Lymphocytes and Increased by Natalizumab in Multiple Sclerosis ». *Cell Reports* 18 (1): 213-24. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.006>.
90. Coates, Hudson W, Isabelle M Capell-Hattam, Ellen M Olzomer, Ximing Du, Rhonda Farrell, Hongyuan Yang, Frances L Byrne, et Andrew J Brown. 2023. « Hypoxia Truncates and Constitutively Activates the Key Cholesterol Synthesis Enzyme Squalene Monooxygenase ». *eLife* 12 (janvier):e82843. <https://doi.org/10.7554/eLife.82843>.
91. Coelingh Bennink, H. J. T., C. F. Holinka, et E. Diczfalusy. 2008. « Estetrol Review: Profile and Potential Clinical Applications ». *Climacteric* 11 (sup1): 47-58. <https://doi.org/10.1080/13697130802073425>.
92. Collins, Jon L., Adam M. Fivush, Michael A. Watson, Cristin M. Galardi, Michael C. Lewis, Linda B. Moore, Derek J. Parks, et al. 2002. « Identification of a Nonsteroidal Liver X Receptor Agonist through Parallel Array Synthesis of Tertiary Amines ». *Journal of Medicinal Chemistry* 45 (10): 1963-66. <https://doi.org/10.1021/jm0255116>.
93. Combes, Burton, et Geneva Sue Stakelum. 1961. « A LIVER ENZYME THAT CONJUGATES SULFOBROMOPHTHALEIN SODIUM WITH GLUTATHIONE\* ». *Journal of Clinical Investigation* 40 (6): 981-88. <https://doi.org/10.1172/JCI104337>.
94. Cook, Ian T., Zofia Duniec-Dmuchowski, Thomas A. Kocarek, Melissa Runge-Morris, et Charles N. Falany. 2009. « 24-Hydroxycholesterol Sulfation by Human Cytosolic Sulfotransferases: Formation of Monosulfates and Disulfates, Molecular Modeling, Sulfatase Sensitivity, and Inhibition of Liver X Receptor Activation ». *Drug Metabolism and Disposition* 37 (10): 2069-78. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.025759>.
95. Cook, R. P., et J. D. MacDougall. 1968. « Experimental Atherosclerosis in Rabbits after Feeding Cholestanetriol ». *British Journal of Experimental Pathology* 49 (3): 265-71.
96. Cooper, J.A., H.J. Church, et H.Y. Wu. 2020. « Cholestane-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -Triol: Further Insights into the Performance of This Oxysterol in Diagnosis of Niemann-Pick Disease Type C ». *Molecular Genetics and Metabolism* 130 (1): 77-86. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.02.008>.
97. Costet, Philippe, Yi Luo, Nan Wang, et Alan R. Tall. 2000. « Sterol-Dependent Transactivation of the ABC1 Promoter by the Liver X Receptor/Retinoid X Receptor ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (36): 28240-45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003337200>.
98. Crick, Peter J., Jennifer Aponte, T. William Bentley, Ian Matthews, Yuqin Wang, et William J. Griffiths. 2014. « Evaluation of Novel Derivatisation Reagents for the Analysis of Oxysterols ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446 (3): 756-61. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.173>.

99. Crosignani, Andrea, Marina Del Puppo, Matteo Longo, Emma De Fabiani, Donatella Caruso, Massimo Zuin, Mauro Podda, Norman B. Javitt, et Marzia Galli Kienle. 2007. « Changes in Classic and Alternative Pathways of Bile Acid Synthesis in Chronic Liver Disease ». *Clinica Chimica Acta* 382 (1-2): 82-88. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.03.025>.
100. Cuylen, Sara, Claudia Blaukopf, Antonio Z. Politi, Thomas Müller-Reichert, Beate Neumann, Ina Poser, Jan Ellenberg, Anthony A. Hyman, et Daniel W. Gerlich. 2016. « Ki-67 Acts as a Biological Surfactant to Disperse Mitotic Chromosomes ». *Nature* 535 (7611): 308-12. <https://doi.org/10.1038/nature18610>.
101. Dai, Xiaofeng, Liangjian Xiang, Ting Li, et Zhonghu Bai. 2016. « Cancer Hallmarks, Biomarkers and Breast Cancer Molecular Subtypes ». *Journal of Cancer* 7 (10): 1281-94. <https://doi.org/10.7150/jca.13141>.
102. Dang, Eric V., Jeffrey G. McDonald, David W. Russell, et Jason G. Cyster. 2017. « Oxysterol Restraint of Cholesterol Synthesis Prevents AIM2 Inflammasome Activation ». *Cell* 171 (5): 1057-1071.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.029>.
103. Danielsson, Henry. 1973. « Mechanisms of Bile Acid Biosynthesis ». In *The Bile Acids, Chemistry, Physiology, and Metabolism*, édité par Padmanabhan P. Nair et David Kritchevsky, 1-32. Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-0898-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-0898-0_1).
104. De Medina, P, B Payré, N Boubekeur, J Bertrand-Michel, F Tercé, S Silvente-Poirot, et M Poirot. 2009. « Ligands of the Antiestrogen-Binding Site Induce Active Cell Death and Autophagy in Human Breast Cancer Cells through the Modulation of Cholesterol Metabolism ». *Cell Death & Differentiation* 16 (10): 1372-84. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.62>.
105. De Medina, Philippe, Silia Ayadi, Khadijetou Diallo, Julio Buñay, Laly Pucheu, Régis Soulès, Michel Record, et al. 2024. « The Cholesterol-5,6-Epoxyde Hydrolase: A Metabolic Checkpoint in Several Diseases ». In *Implication of Oxysterols and Phytosterols in Aging and Human Diseases*, édité par Gérard Lizard, 1440:149-61. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-43883-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-031-43883-7_8).
106. De Medina, Philippe, Khadijetou Diallo, Emilie Huc-Claustre, Mehdi Attia, Régis Soulès, Sandrine Silvente-Poirot, et Marc Poirot. 2021. « The 5,6-epoxycholesterol Metabolic Pathway in Breast Cancer: Emergence of New Pharmacological Targets ». *British Journal of Pharmacology* 178 (16): 3248-60. <https://doi.org/10.1111/bph.15205>.
107. De Medina, Philippe, Michael R. Paillasse, Bruno Payré, Sandrine Silvente-Poirot, et Marc Poirot. 2009. « Synthesis of New Alkylaminooxysterols with Potent Cell Differentiating Activities: Identification of Leads for the Treatment of Cancer and Neurodegenerative Diseases ». *Journal of Medicinal Chemistry* 52 (23): 7765-77. <https://doi.org/10.1021/jm901063e>.
108. De Medina, Philippe, Michael R. Paillasse, Gregory Segala, Marc Poirot, et Sandrine Silvente-Poirot. 2010a. « Identification and Pharmacological Characterization of Cholesterol-5,6-Epoxyde Hydrolase as a Target for Tamoxifen and AEBS Ligands ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (30): 13520-25. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002922107>.
109. Philippe de Medina, Michael R. Paillasse, Gregory Segala, Marc Poirot, Sandrine Silvente-Poirot. 2010b. « Identification and Pharmacological Characterization of Cholesterol-5,6-Epoxyde Hydrolase as a Target for Tamoxifen and AEBS Ligands ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (30): 13520-25. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002922107>.
110. De Medina, Philippe, Michael R. Paillasse, Gregory Segala, Maud Voisin, Loubna Mhamdi, Florence Dalenc, Magali Lacroix-Triki, et al. 2013. « Dendrogenin A Arises from Cholesterol and Histamine Metabolism and Shows Cell Differentiation and Anti-Tumour Properties ». *Nature Communications* 4 (1): 1840. <https://doi.org/10.1038/ncomms2835>.
111. De Medina, Philippe, Sandrine Silvente-Poirot, et Marc Poirot. 2009a. « Tamoxifen and AEBS Ligands Induced Apoptosis and Autophagy in Breast Cancer Cells through the Stimulation of Sterol Accumulation ». *Autophagy* 5 (7): 1066-67. <https://doi.org/10.4161/auto.5.7.9820>.
112. De Medina, Philippe, Sandrine Silvente-Poirot, et Marc Poirot. 2022. « Oxysterols Are Potential Physiological Regulators of Ageing ». *Ageing Research Reviews* 77 (mai):101615. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101615>.

113. Decker, Martina, Michael Arand, et Annette Cronin. 2009. « Mammalian Epoxide Hydrolases in Xenobiotic Metabolism and Signalling ». *Archives of Toxicology* 83 (4): 297-318. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0416-0>.
114. Decker, Nina Sophia, Theron Johnson, Johannes A. Vey, Charlotte Le Cornet, Sabine Behrens, Nadia Obi, Rudolf Kaaks, Jenny Chang-Claude, et Renée Turzanski Fortner. 2023. « Circulating Oxysterols and Prognosis among Women with a Breast Cancer Diagnosis: Results from the MARIE Patient Cohort ». *BMC Medicine* 21 (1): 438. <https://doi.org/10.1186/s12916-023-03152-7>.
115. Defesche, Joep. 2004. « Low-Density Lipoprotein Receptor-Its Structure, Function, and Mutations ». *Seminars in Vascular Medicine* 4 (01): 5-11. <https://doi.org/10.1055/s-2004-822993>.
116. Dembitsky, Valery M. 2023. « Bioactive Steroids Bearing Oxirane Ring ». *Biomedicines* 11 (8): 2237. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11082237>.
117. Denechaud, Pierre-Damien, Pascale Bossard, Jean-Marc A. Lobaccaro, Lesley Millatt, Bart Staels, Jean Girard, et Catherine Postic. 2008. « ChREBP, but Not LXRs, Is Required for the Induction of Glucose-Regulated Genes in Mouse Liver ». *Journal of Clinical Investigation*, février, JCI34314. <https://doi.org/10.1172/JCI34314>.
118. DeRouen, Mindy C., Juan Yang, Yuqing Li, Adrian A. Franke, Anne N. Tome, Kami K. White, Brenda Y. Hernandez, et al. 2023. « Circulating 27-Hydroxycholesterol, Lipids, and Steroid Hormones in Breast Cancer Risk: A Nested Case–Control Study of the Multiethnic Cohort Study ». *Breast Cancer Research* 25 (1): 95. <https://doi.org/10.1186/s13058-023-01693-6>.
119. Di Ciaula, Agostino, Gabriella Garruti, Raquel Lunardi Baccetto, Emilio Molina-Molina, Leonilde Bonfrate, David Q.-H. Wang, et Piero Portincasa. 2017. « Bile Acid Physiology ». *Annals of Hepatology* 16 (novembre):S4-14. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5493>.
120. DiBlasio-Smith, Elizabeth A, Maya Arai, Elaine M Quinet, Mark J Evans, Tad Kornaga, Michael D Basso, Liang Chen, et al. 2008. « Discovery and Implementation of Transcriptional Biomarkers of Synthetic LXR Agonists in Peripheral Blood Cells ». *Journal of Translational Medicine* 6 (1): 59. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-6-59>.
121. Diczfalusy, Ulf, Hanna Nylén, Pontus Elander, et Leif Bertilsson. 2011. « 4 $\beta$ -hydroxycholesterol, an Endogenous Marker of CYP3A4/5 Activity in Humans ». *British Journal of Clinical Pharmacology* 71 (2): 183-89. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2010.03773.x>.
122. Diczfalusy, Ulf, Katarina E. Olofsson, Ann-Margreth Carlsson, Mei Gong, Douglas T. Golenbock, Olav Rooyackers, Urban Fläring, et Harry Björkbacka. 2009. « Marked Upregulation of Cholesterol 25-Hydroxylase Expression by Lipopolysaccharide ». *Journal of Lipid Research* 50 (11): 2258-64. <https://doi.org/10.1194/jlr.M900107-JLR200>.
123. Dietschy, John M., et Stephen D. Turley. 2002. « Control of Cholesterol Turnover in the Mouse ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (6): 3801-4. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100057200>.
124. John M Dietschy, Stephen D Turley 2004. « Thematic Review Series: Brain Lipids. Cholesterol Metabolism in the Central Nervous System during Early Development and in the Mature Animal ». *Journal of Lipid Research* 45 (8): 1375-97. <https://doi.org/10.1194/jlr.R400004-JLR200>.
125. Dirr, Heini, Peter Reinemer, et Robert Huber. 1994. « X-ray Crystal Structures of Cytosolic Glutathione S - transferases: Implications for Protein Architecture, Substrate Recognition and Catalytic Function ». *European Journal of Biochemistry* 220 (3): 645-61. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18666.x>.
126. Durado, Daniel F. A. R., Pedro Alexandrino Fernandes, Bengt Mannervik, et Maria João Ramos. 2014. « Isomerization of  $\Delta^5$ -Androstene-3,17-Dione into  $\Delta^4$ -Androstene-3,17-Dione Catalyzed by Human Glutathione Transferase A3-3: A Computational Study Identifies a Dual Role for Glutathione ». *The Journal of Physical Chemistry A* 118 (31): 5790-5800. <https://doi.org/10.1021/jp410810q>.
127. Drayer, N.M., Kenneth D. Roberts, Lajos Bandi, et Seymour Lieberman. 1964. « The Isolation of Cholesterol Sulfate from Bovine Adrenals ». *Journal of Biological Chemistry* 239 (9): PC3112-14. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)93862-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)93862-7).
128. DuBois, G.C., E. Appella, W. Levin, A.Y. Lu, et D.M. Jerina. 1978. « Hepatic Microsomal Epoxide Hydrase. Involvement of a Histidine at the Active Site Suggests a Nucleophilic Mechanism. » *Journal of Biological Chemistry* 253 (9): 2932-39. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)40785-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)40785-X).

129. Dunnwald, Lisa K, Mary Anne Rossing, et Christopher I Li. 2007. « Hormone Receptor Status, Tumor Characteristics, and Prognosis: A Prospective Cohort of Breast Cancer Patients ». *Breast Cancer Research* 9 (1): R6. <https://doi.org/10.1186/bcr1639>.
130. DuSell, Carolyn D., Michihisa Umetani, Philip W. Shaul, David J. Mangelsdorf, et Donald P. McDonnell. 2008. « 27-Hydroxycholesterol Is an Endogenous Selective Estrogen Receptor Modulator ». *Molecular Endocrinology* 22 (1): 65-77. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0383>.
131. Dzeletovic, S., O. Breuer, E. Lund, et U. Diczfalusy. 1995. « Determination of Cholesterol Oxidation Products in Human Plasma by Isotope Dilution-Mass Spectrometry ». *Analytical Biochemistry* 225 (1): 73-80. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1110>.
132. Dzeletovic, Susanna, Amir Babiker, Erik Lund, et Ulf Diczfalusy. 1995. « Time Course of Oxysterol Formation during in Vitro Oxidation of Low Density Lipoprotein ». *Chemistry and Physics of Lipids* 78 (2): 119-28. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(95\)02489-6](https://doi.org/10.1016/0009-3084(95)02489-6).
133. Edwards, John O., et Ralph G. Pearson. 1962. « The Factors Determining Nucleophilic Reactivities ». *Journal of the American Chemical Society* 84 (1): 16-24. <https://doi.org/10.1021/ja00860a005>.
134. El-Abid, Jamal, Dindet Steve-Evanes K. L. C. Koffi Teki, Abed Bil, Agnès Denys, Aurélie Vallin, Corentin Lefebvre, Fabrice Allain, Vincent Chagnault, et José Kovensky. 2024. « Comparative Analysis of Sulfated and Sulfonated Disaccharide Analogs as TLR4 Modulators and Heparanase Inhibitors ». *New Journal of Chemistry* 48 (21): 9559-66. <https://doi.org/10.1039/D4NJ01326C>.
135. Elias, Ellen R., Mira B. Irons, Anne D. Hurley, G. Stephen Tint, et Gerald Salen. 1997. « Clinical Effects of Cholesterol Supplementation in Six Patients with the Smith-Lemli-Opitz Syndrome (SLOS) ». *American Journal of Medical Genetics* 68 (3): 305-10. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19970131\)68:3<305::AID-AJMG11>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19970131)68:3<305::AID-AJMG11>3.0.CO;2-X).
136. Engel, Thomas, Aloys Lueken, Günther Bode, Uwe Hobohm, Stefan Lorkowski, Bernhard Schlueter, Stephan Rust, et al. 2004. « ADP-ribosylation Factor (ARF)-like 7 (ARL7) Is Induced by Cholesterol Loading and Participates in Apolipoprotein AI-dependent Cholesterol Export ». *FEBS Letters* 566 (1-3): 241-46. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.048>.
137. Engelking, Luke J., Bret M. Evers, James A. Richardson, Joseph L. Goldstein, Michael S. Brown, et Guosheng Liang. 2006. « Severe Facial Clefting in Insig-Deficient Mouse Embryos Caused by Sterol Accumulation and Reversed by Lovastatin ». *Journal of Clinical Investigation* 116 (9): 2356-65. <https://doi.org/10.1172/JCI28988>.
138. Ercoli, Alberto, et Pietro De Ruggieri. 1953. « THE CONSTITUTION OF CEREBROSTEROL, A HYDROXYCHOLESTEROL ISOLATED FROM HORSE BRAIN ». *Journal of the American Chemical Society* 75 (13): 3284-3284. <https://doi.org/10.1021/ja01109a515>.
139. Eroles, Pilar, Ana Bosch, J. Alejandro Pérez-Fidalgo, et Ana Lluch. 2012. « Molecular Biology in Breast Cancer: Intrinsic Subtypes and Signaling Pathways ». *Cancer Treatment Reviews* 38 (6): 698-707. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>.
140. Esterman, A L, H Baum, N B Javitt, et G J Darlington. 1983. « 26-Hydroxycholesterol: Regulation of Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase Activity in Chinese Hamster Ovary Cell Culture. » *Journal of Lipid Research* 24 (10): 1304-9. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)37880-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)37880-9).
141. Fahy, Eoin, Dawn Cotter, Manish Sud, et Shankar Subramaniam. 2011. « Lipid Classification, Structures and Tools ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811 (11): 637-47. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.009>.
142. Fakheri, Robert J., et Norman B. Javitt. 2012. « 27-Hydroxycholesterol, Does It Exist? On the Nomenclature and Stereochemistry of 26-Hydroxylated Sterols ». *Steroids* 77 (6): 575-77. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.02.006>.
143. Falany, Charles N. 1997. « Introduction: Changing View of Sulfation and the Cytosolic Sulfotransferases ». *The FASEB Journal* 11 (1): 1-2. <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.1.9034159>.
144. Falany, Josie L., et Charles N. Falany. 2007. « Interactions of the Human Cytosolic Sulfotransferases and Steroid Sulfatase in the Metabolism of Tibolone and Raloxifene ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 107 (3-5): 202-10. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.03.046>.



145. Faust, Phyllis L., et Werner J. Kovacs. 2014. « Cholesterol Biosynthesis and ER Stress in Peroxisome Deficiency ». *Biochimie* 98 (mars):75-85. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.10.019>.
146. Faye, Jean-Charles, Bernard Lasserre, et Francis Bayard. 1980. « Antiestrogen Specific, High Affinity Saturable Binding Sites in Rat Uterine Cytosol ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 93 (4): 1225-31. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(80\)90620-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(80)90620-8).
147. Fieser, Louis F., Wei-Yuan Huang, et Bidyut Kamal Bhattacharyya. 1957. « Cholesterol and Companions. X. <sup>1</sup> The Diol Fraction ». *The Journal of Organic Chemistry* 22 (11): 1380-84. <https://doi.org/10.1021/jo01362a021>.
148. Fieser, Louis F., et Srinivasa. Rajagopalan. 1949. « Selective Oxidation with N-Bromosuccinimide. II. Cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol ». *Journal of the American Chemical Society* 71 (12): 3938-41. <https://doi.org/10.1021/ja01180a016>.
149. Forrester, Lesley M., John D. Hayes, Rosemary Millis, Diana Barnes, Adrian L. Harris, John J. Schlager, Garth Powis, et C. Roland Wolf. 1990. « Expression of Glutathione S-Transferases and Cytochrome P450 in Normal and Tumor Breast Tissue ». *Carcinogenesis* 11 (12): 2163-70. <https://doi.org/10.1093/carcin/11.12.2163>.
150. Fradera, Xavier, Diep Vu, Olaf Nimz, Robert Skene, David Hosfield, Robert Wynands, Andrew J. Cooke, et al. 2010. « X-Ray Structures of the LXRA LBD in Its Homodimeric Form and Implications for Heterodimer Signaling ». *Journal of Molecular Biology* 399 (1): 120-32. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.005>.
151. Fredrickson, Donald S., et Katsuto Ono. 1956. « The in Vitro Production of 25- and 26-Hydroxycholesterol and Their in Vivo Metabolism ». *Biochimica et Biophysica Acta* 22 (1): 183-84. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(56\)90236-0](https://doi.org/10.1016/0006-3002(56)90236-0).
152. Frimer, Aryeh A. 1979. « The Reaction of Singlet Oxygen with Olefins: The Question of Mechanism ». *Chemical Reviews* 79 (5): 359-87. <https://doi.org/10.1021/cr60321a001>.
153. Fu, Hang, Florian Spieler, Julia Großmann, Dagmar Riemann, Marie Larisch, Bernhard Hiebl, Kathrin Schlecht, et al. 2014. « Interleukin-1 Potently Contributes to 25-Hydroxycholesterol-Induced Synergistic Cytokine Production in Smooth Muscle Cell-Monocyte Interactions ». *Atherosclerosis* 237 (2): 443-52. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.002>.
154. Fu, Xin, et Zhaosong Wang. 2024. « DHCR24 in Tumor Diagnosis and Treatment: A Comprehensive Review ». *Technology in Cancer Research & Treatment* 23 (janvier):15330338241259780. <https://doi.org/10.1177/15330338241259780>.
155. Fuda, Hirotoshi, Norman B. Javitt, Kuniko Mitamura, Shigeo Ikegawa, et Charles A. Strott. 2007. « Oxysterols Are Substrates for Cholesterol Sulfotransferase ». *Journal of Lipid Research* 48 (6): 1343-52. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700018-JLR200>.
156. Fuda, Hirotoshi, Young C. Lee, Chikara Shimizu, Norman B. Javitt, et Charles A. Strott. 2002. « Mutational Analysis of Human Hydroxysteroid Sulfotransferase SULT2B1 Isoforms Reveals That Exon 1B of the SULT2B1 Gene Produces Cholesterol Sulfotransferase, Whereas Exon 1A Yields Pregnenolone Sulfotransferase ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (39): 36161-66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207165200>.
157. Fürst, A., et Pl. A. Plattner. 1949. « Über Steroide Und Sexualhormone. 160. Mitteilung. 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ - Und 2 $\beta$ , 3 $\beta$ -Oxido-chlolestane; Konfiguration Der 2-Oxy-cholestane ». *Helvetica Chimica Acta* 32 (1): 275-83. <https://doi.org/10.1002/hlca.19490320139>.
158. Gan, Xiaodong, Rebecca Kaplan, John G. Menke, Karen MacNaul, Yuli Chen, Carl P. Sparrow, Gaochao Zhou, Samuel D. Wright, et Tian-Quan Cai. 2001. « Dual Mechanisms of ABCA1 Regulation by Geranylgeranyl Pyrophosphate ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (52): 48702-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109402200>.
159. Ganesan, Latha P., Jessica M. Mates, Alana M. Cheplowitz, Christina L. Avila, Jason M. Zimmerer, Zhili Yao, Andrei Maiseyeu, Murugesan V. S. Rajaram, John M. Robinson, et Clark L. Anderson. 2016. « Scavenger Receptor B1, the HDL Receptor, Is Expressed Abundantly in Liver Sinusoidal Endothelial Cells ». *Scientific Reports* 6 (1): 20646. <https://doi.org/10.1038/srep20646>.
160. Gaoua, Wassila, Claude Wolf, Françoise Chevy, Françoise Ilien, et Charles Roux. 2000. « Cholesterol Deficit but Not Accumulation of Aberrant Sterols Is the Major Cause of the Teratogenic Activity in the Smith-Lemli-

- Opitz Syndrome Animal Model ». *Journal of Lipid Research* 41 (4): 637-46. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32412-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32412-3).
161. Garcia-Calvo, Margarita, JeanMarie Lisnock, Herbert G. Bull, Brian E. Hawes, Duane A. Burnett, Matthew P. Braun, James H. Crona, et al. 2005. « The Target of Ezetimibe Is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (23): 8132-37. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500269102>.
  162. Garreau, Jennifer R., Tammy DeLaMelena, Deb Walts, Kasra Karamlou, et Nathalie Johnson. 2006. « Side Effects of Aromatase Inhibitors versus Tamoxifen: The Patients' Perspective ». *The American Journal of Surgery* 192 (4): 496-98. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2006.06.018>.
  163. Gerdes, Johannes, Ulrich Schwab, Hilmar Lemke, et Harald Stein. 1983. « Production of a Mouse Monoclonal Antibody Reactive with a Human Nuclear Antigen Associated with Cell Proliferation ». *International Journal of Cancer* 31 (1): 13-20. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910310104>.
  164. Ghzaïel, Imen, Khoulood Sassi, Amira Zarrouk, Shubhrama Ghosh, Irundika H K Dias, Thomas Nury, Mohamed Ksila, et al. 2022. « Sources of 7-Ketocholesterol, Metabolism and Inactivation Strategies: Food and Biomedical Applications ». *Redox Experimental Medicine* 2022 (1): R40-56. <https://doi.org/10.1530/REM-22-0005>.
  165. Girotti, Albert W., et Witold Korytowski. 2000. « [9] Cholesterol as a Singlet Oxygen Detector in Biological Systems ». In *Methods in Enzymology*, 319:85-100. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)19011-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)19011-1).
  166. Go, Gwang-Woong, et Arya Mani. 2012. « Low-Density Lipoprotein Receptor (LDLR) Family Orchestrates Cholesterol Homeostasis ». *The Yale Journal of Biology and Medicine* 85 (1): 19-28.
  167. Goad, L. John, et Toshihiro Akihisa. 1997. *Analysis of Sterols*. Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-1447-6>.
  168. Gold, Elizabeth S., Alan H. Diercks, Irina Podolsky, Rebecca L. Podyminogin, Peter S. Askovich, Piper M. Treuting, et Alan Aderem. 2014. « 25-Hydroxycholesterol Acts as an Amplifier of Inflammatory Signaling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (29): 10666-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404271111>.
  169. Goldstein, Joseph L., Russell A. DeBose-Boyd, et Michael S. Brown. 2006. « Protein Sensors for Membrane Sterols ». *Cell* 124 (1): 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.022>.
  170. Gonen, Ayelet, et Yury I. Miller. 2020. « From Inert Storage to Biological Activity—In Search of Identity for Oxidized Cholesteryl Esters ». *Frontiers in Endocrinology* 11 (novembre):602252. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.602252>.
  171. Goodwin, Bryan, Michael A. Watson, Hwajin Kim, Ji Miao, Jongsook Kim Kemper, et Steven A. Kliewer. 2003. « Differential Regulation of Rat and Human CYP7A1 by the Nuclear Oxysterol Receptor Liver X Receptor- $\alpha$  ». *Molecular Endocrinology* 17 (3): 386-94. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0246>.
  172. Gorzynski Smith, Janice. 1984. « Synthetically Useful Reactions of Epoxides ». *Synthesis* 1984 (08): 629-56. <https://doi.org/10.1055/s-1984-30921>.
  173. Graf, Gregory A., Liqing Yu, Wei-Ping Li, Robert Gerard, Pamela L. Tuma, Jonathan C. Cohen, et Helen H. Hobbs. 2003. « ABCG5 and ABCG8 Are Obligate Heterodimers for Protein Trafficking and Biliary Cholesterol Excretion ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (48): 48275-82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310223200>.
  174. Griffiths, William J., et Yuqin Wang. 2019. « Oxysterol Research: A Brief Review ». *Biochemical Society Transactions* 47 (2): 517-26. <https://doi.org/10.1042/BST20180135>.
  175. William J. Griffiths et Yuqin Wang. 2020. « Oxysterols as Lipid Mediators: Their Biosynthetic Genes, Enzymes and Metabolites ». *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 147 (avril):106381. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2019.106381>.
  176. Griffiths, William J., Eylan Yutuc, Jonas Abdel-Khalik, Peter J. Crick, Thomas Hearn, Alison Dickson, Brian W. Bigger, et al. 2019. « Metabolism of Non-Enzymatically Derived Oxysterols: Clues from Sterol Metabolic Disorders ». *Free Radical Biology and Medicine* 144 (novembre):124-33. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.020>.



177. Guengerich, F. Peter. 1999. « CYTOCHROME P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39 (1): 1-17. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.1>.
178. Gumulka, Jerzy, Jan St. Pyrek, et Leland L. Smith. 1982. « Interception of Discrete Oxygen Species in Aqueous Media by Cholesterol: Formation of Cholesterol Epoxides and Secosterols ». *Lipids* 17 (3): 197-203. <https://doi.org/10.1007/BF02535103>.
179. Gumulka, Jerzy, et Leland L. Smith. 1983. « Ozonization of cholesterol ». *Journal of the American Chemical Society* 105 (7): 1972-79. <https://doi.org/10.1021/ja00345a052>.
180. Guo, Hao-Ting, Yan Tang, Sheng-Han Liu, Yang Ma, Shen Fang, Henry J. Curran, et Chong-Wen Zhou. 2023. « Kinetic Properties Study of H Atom Abstraction by CH<sub>3</sub> O<sub>2</sub> Radicals from Fuel Molecules with Different Functional Groups ». *The Journal of Physical Chemistry A* 127 (8): 1960-74. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.2c08100>.
181. Gutierrez, Carolina, et Rachel Schiff. 2011. « HER2: Biology, Detection, and Clinical Implications ». *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 135 (1): 55-62. <https://doi.org/10.5858/2010-0454-RAR.1>.
182. Györfy, Balázs. 2021. « Survival Analysis across the Entire Transcriptome Identifies Biomarkers with the Highest Prognostic Power in Breast Cancer ». *Computational and Structural Biotechnology Journal* 19:4101-9. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.07.014>.
183. H. W. Gardner, H W. 1986. « 3 Reactions of Hydroperoxides- Products of High Molecular Weight ».
184. Habig, William H., Michael J. Pabst, et William B. Jakoby. 1974. « Glutathione S-Transferases ». *Journal of Biological Chemistry* 249 (22): 7130-39. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8).
185. William H. Habig, Michael J. Pabst, William B. Jakoby. 1976. « Glutathione S-Transferase AA from Rat Liver ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 175 (2): 710-16. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(76\)90563-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(76)90563-4).
186. Hannedouche, Sébastien, Juan Zhang, Tangsheng Yi, Weijun Shen, Deborah Nguyen, João P. Pereira, Danilo Guerini, et al. 2011. « Oxysterols Direct Immune Cell Migration via EBI2 ». *Nature* 475 (7357): 524-27. <https://doi.org/10.1038/nature10280>.
187. Hanukoglu, Israel. 1992. « Steroidogenic Enzymes: Structure, Function, and Role in Regulation of Steroid Hormone Biosynthesis ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 43 (8): 779-804. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(92\)90307-5](https://doi.org/10.1016/0960-0760(92)90307-5).
188. Happle, R. 1979. « X-Linked Dominant Chondrodysplasia Punctata ». *Human genetics* vol. 53,1 (1979): 65-73. <https://doi.org/10.1007/BF00289453>.
189. Haris, Parvez I. 2016. « Cholesterol: A Chemical of Life and Death ». *Biomedical Spectroscopy and Imaging* 5 (s1): S1-3. <https://doi.org/10.3233/BSI-160161>.
190. Has, Cristina, Leena Bruckner-Tuderman, Heiko Traupe, Udo Seedorf, Frank Kannenberg, Elzo Folkers, Regina Fölster-Holst, et Ivo Baric. 2002. « Gas Chromatography–Mass Spectrometry and Molecular Genetic Studies in Families with the Conradi–Hünemann–Happle Syndrome ». *Journal of Investigative Dermatology* 118 (5): 851-58. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01761.x>.
191. Hayes, John D., Jack U. Flanagan, et Ian R. Jowsey. 2005. « GLUTATHIONE TRANSFERASES ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45 (1): 51-88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>.
192. Hello, M., A. David, et S. Barbarot. 2010. « Syndrome de Conradi–Hünemann–Happle de disposition unilatérale ». *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie* 137 (1): 44-47. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2009.11.006>.
193. Helmschrodt, Christin, Susen Becker, Jenny Schröter, Max Hecht, Gabriela Aust, Joachim Thiery, et Uta Ceglarek. 2013. « Fast LC–MS/MS Analysis of Free Oxysterols Derived from Reactive Oxygen Species in Human Plasma and Carotid Plaque ». *Clinica Chimica Acta* 425 (octobre):3-8. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.06.022>.
194. Heo, Gun-Young, Ilya Bederman, Natalia Mast, Wei-Li Liao, Illarion V. Turko, et Irina A. Pikuleva. 2011a. « Conversion of 7-Ketocholesterol to Oxysterol Metabolites by Recombinant CYP27A1 and Retinal Pigment Epithelial Cells ». *Journal of Lipid Research* 52 (6): 1117-27. <https://doi.org/10.1194/jlr.M014217>.

195. Gun-Young Heo, Ilya Bederman, Natalia Mast, Wei-Li Liao, Illarion V. Turko, and Irina A. Pikuleva. 2011b. « Conversion of 7-Ketocholesterol to Oxysterol Metabolites by Recombinant CYP27A1 and Retinal Pigment Epithelial Cells ». *Journal of Lipid Research* 52 (6): 1117-27. <https://doi.org/10.1194/jlr.M014217>.
196. Her, Chengtao, Thomas C. Wood, Evan E. Eichler, Harvey W. Mohrenweiser, Louis S. Ramagli, Michael J. Siciliano, et Richard M. Weinshilboum. 1998. « Human Hydroxysteroid Sulfotransferase SULT2B1: Two Enzymes Encoded by a Single Chromosome 19 Gene ». *Genomics* 53 (3): 284-95. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5518>.
197. Herman, Gail E., Richard I. Kelley, V. Pureza, D. Smith, Kevin Kopacz, James Pitt, Rebecca Sutphen, Leslie J. Sheffield, et Aida B. Metzenberg. 2002. « Characterization of Mutations in 22 Females with X-Linked Dominant Chondrodysplasia Punctata (Happle Syndrome) ». *Genetics in Medicine* 4 (6): 434-38. <https://doi.org/10.1097/00125817-200211000-00006>.
198. Heverin, Maura, Nenad Bogdanovic, Dieter Lütjohann, Thomas Bayer, Irina Pikuleva, Lionel Bretillon, Ulf Diczfalussy, Bengt Winblad, et Ingemar Björkhem. 2004. « Changes in the Levels of Cerebral and Extracerebral Sterols in the Brain of Patients with Alzheimer's Disease ». *Journal of Lipid Research* 45 (1): 186-93. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300320-JLR200>.
199. Heyman, Richard A., David J. Mangelsdorf, Jacqueline A. Dyck, Robert B. Stein, Gregor Eichele, Ronald M. Evans, et Christina Thaller. 1992. « 9-Cis Retinoic Acid Is a High Affinity Ligand for the Retinoid X Receptor ». *Cell* 68 (2): 397-406. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90479-V](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90479-V).
200. Hirayama, Takeshi, Yuji Mizokami, Akira Honda, Yasuhiko Homma, Tadashi Ikegami, Yoshifumi Saito, Teruo Miyazaki, et Yasushi Matsuzaki. 2009. « Serum Concentration of 27-hydroxycholesterol Predicts the Effects of High-cholesterol Diet on Plasma LDL Cholesterol Level ». *Hepatology Research* 39 (2): 149-56. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2008.00450.x>.
201. « Hock Rearrangement: (Hock Cleavage) ». 2010. In *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, par Zerong Wang, 1<sup>re</sup> éd., 1438-42. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470638859.conrr321>.
202. Hoerer, Stefan, Angela Schmid, Armin Heckel, Ralph-M. Budzinski, et Herbert Nar. 2003. « Crystal Structure of the Human Liver X Receptor  $\beta$  Ligand-Binding Domain in Complex with a Synthetic Agonist ». *Journal of Molecular Biology* 334 (5): 853-61. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.10.033>.
203. Hoffman, Harry N., et Donald S. Fredrickson. 1965. « Tangier Disease (Familial High Density Lipoprotein Deficiency) ». *The American Journal of Medicine* 39 (4): 582-93. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(65\)90081-1](https://doi.org/10.1016/0002-9343(65)90081-1).
204. Honda, Akira, Teruo Miyazaki, Tadashi Ikegami, Junichi Iwamoto, Tomomi Maeda, Takeshi Hirayama, Yoshifumi Saito, Tamio Teramoto, et Yasushi Matsuzaki. 2011. « Cholesterol 25-Hydroxylation Activity of CYP3A ». *Journal of Lipid Research* 52 (8): 1509-16. <https://doi.org/10.1194/jlr.M014084>.
205. Hong, Cynthia, Robert Walczak, Helena Dhamko, Michelle N. Bradley, Chaitra Marathe, Rima Boyadjian, Jon V. Salazar, et Peter Tontonoz. 2011. « Constitutive Activation of LXR in Macrophages Regulates Metabolic and Inflammatory Gene Expression: Identification of ARL7 as a Direct Target ». *Journal of Lipid Research* 52 (3): 531-39. <https://doi.org/10.1194/jlr.M010686>.
206. Hopp, Torsten A., Heidi L. Weiss, Susan G. Hilsenbeck, Yukun Cui, D. Craig Allred, Kathryn B. Horwitz, et Suzanne A. W. Fuqua. 2004. « Breast Cancer Patients with Progesterone Receptor PR-A-Rich Tumors Have Poorer Disease-Free Survival Rates ». *Clinical Cancer Research* 10 (8): 2751-60. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0141>.
207. Hörlein, Andreas J., Anders M. Näär, Thorsten Heinzl, Joseph Torchia, Bernd Gloss, Riki Kurokawa, Aimee Ryan, et al. 1995. « Ligand-Independent Repression by the Thyroid Hormone Receptor Mediated by a Nuclear Receptor Co-Repressor ». *Nature* 377 (6548): 397-404. <https://doi.org/10.1038/377397a0>.
208. Horton, Jay D., Joseph L. Goldstein, et Michael S. Brown. 2002. « SREBPs: Activators of the Complete Program of Cholesterol and Fatty Acid Synthesis in the Liver ». *Journal of Clinical Investigation* 109 (9): 1125-31. <https://doi.org/10.1172/JCI0215593>.
209. Houck, Keith A., Kristen M. Borchert, Christopher D. Hepler, Jeffrey S. Thomas, Kelli S. Bramlett, Laura F. Michael, et Thomas P. Burris. 2004. « T0901317 Is a Dual LXR/FXR Agonist ». *Molecular Genetics and Metabolism* 83 (1-2): 184-87. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2004.07.007>.

210. Hu, Haiyan, Yuehan Zhou, Tiandong Leng, Ailing Liu, Youqiong Wang, Xiuhua You, Jingkai Chen, et al. 2014. « The Major Cholesterol Metabolite Cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -Triol Functions as an Endogenous Neuroprotectant ». *The Journal of Neuroscience* 34 (34): 11426-38. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0344-14.2014>.
211. Hua, X, C Yokoyama, J Wu, M R Briggs, M S Brown, J L Goldstein, et X Wang. 1993. « SREBP-2, a Second Basic-Helix-Loop-Helix-Leucine Zipper Protein That Stimulates Transcription by Binding to a Sterol Regulatory Element. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (24): 11603-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11603>.
212. Hult, M., B. Elleby, N. Shafqat, S. Svensson, A. Rane, H. Jönvall, L. Abrahmsen, et U. Oppermann. 2004. « Human and rodent type 1 11 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenases are 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol dehydrogenases involved in oxysterol metabolism ». *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 61 (7-8): 992-99. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3476-y>.
213. Hussain, Hidayat, Ahmed Al-Harrasi, Ivan R. Green, Ishtiaq Ahmed, Ghulam Abbas, et Najeeb Ur Rehman. 2014. « Meta-Chloroperbenzoic Acid (mCPBA): A Versatile Reagent in Organic Synthesis ». *RSC Adv.* 4 (25): 12882-917. <https://doi.org/10.1039/C3RA45702H>.
214. Huuskonen, Jarkko, Phoebe E. Fielding, et Christopher J. Fielding. 2004. « Role of P160 Coactivator Complex in the Activation of Liver X Receptor ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (4): 703-8. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000121202.72593.da>.
215. Hwang, P. 1990. « High-Affinity Binding Sites for Oxygenated Sterols in Rat Liver Microsomes: Possible Identity with Antiestrogen Binding Sites☆ ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1033 (2): 154-61. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(90\)90006-I](https://doi.org/10.1016/0304-4165(90)90006-I).
216. Hwang, P L H. 1986. « Unsaturated Fatty Acids as Endogenous Inhibitors of Tamoxifen Binding to Anti-Oestrogen-Binding Sites ». *Biochemical Journal* 237 (3): 749-55. <https://doi.org/10.1042/bj2370749>.
217. Hwang, P L H. 1987. « Interaction of Unsaturated Fatty Acids with Anti-Oestrogen-Binding Sites ». *Biochemical Journal* 243 (2): 359-64. <https://doi.org/10.1042/bj2430359>.
218. Hwang, P L, et A. Matin. 1989. « Interactions of Sterols with Antiestrogen-Binding Sites: Structural Requirements for High-Affinity Binding. » *Journal of Lipid Research* 30 (2): 239-45. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)38384-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38384-X).
219. Irons, Mira, Ellen R. Elias, Diane Abuelo, Marilyn J. Bull, Carol L. Greene, Virginia P. Johnson, Laura Keppen, Carolyn Schanen, G. Stephen Tint, et Gerald Salen. 1997. « Treatment of Smith-Lemli-Opitz Syndrome: Results of a Multicenter Trial ». *American Journal of Medical Genetics* 68 (3): 311-14. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19970131\)68:3<311::AID-AJMG12>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19970131)68:3<311::AID-AJMG12>3.0.CO;2-W).
220. Iuliano, Luigi. 2011. « Pathways of Cholesterol Oxidation via Non-Enzymatic Mechanisms ». *Chemistry and Physics of Lipids* 164 (6): 457-68. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.06.006>.
221. Janowski, Bethany A., Michael J. Grogan, Stacey A. Jones, G. Bruce Wisely, Steven A. Kliewer, Elias J. Corey, et David J. Mangelsdorf. 1999. « Structural Requirements of Ligands for the Oxysterol Liver X Receptors LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (1): 266-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.1.266>.
222. Janowski, Bethany A., Patricia J. Willy, Thota Rama Devi, J. R. Falck, et David J. Mangelsdorf. 1996. « An Oxysterol Signalling Pathway Mediated by the Nuclear Receptor LXR $\alpha$  ». *Nature* 383 (6602): 728-31. <https://doi.org/10.1038/383728a0>.
223. Javitt, N B, et K Budai. 1989. « Cholesterol and Bile Acid Synthesis in Hep G2 Cells. Metabolic Effects of 26- and 7  $\alpha$ -Hydroxycholesterol ». *Biochemical Journal* 262 (3): 989-92. <https://doi.org/10.1042/bj2620989>.
224. Javitt, Nb. 1990. « 26-Hydroxycholesterol: Synthesis, Metabolism, and Biologic Activities ». *Journal of Lipid Research* 31 (9): 1527-33. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)42337-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)42337-5).
225. Javitt, N.B., E Kok, S Burstein, B Cohen, et J Kutscher. 1981. « 26-Hydroxycholesterol. Identification and Quantitation in Human Serum. » *Journal of Biological Chemistry* 256 (24): 12644-46. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42940-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42940-7).

- 226.Javitt, Norman B. 2002. « 25R,26-Hydroxycholesterol Revisited: Synthesis, Metabolism, and Biologic Roles ». *Journal of Lipid Research* 43 (5): 665-70. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)30106-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)30106-1).
- 227.Javitt, Norman B., Young C. Lee, Chikara Shimizu, Hirotooshi Fuda, et Charles A. Strott. 2001. « Cholesterol and Hydroxycholesterol Sulfotransferases: Identification, Distinction from Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase, and Differential Tissue Expression ». *Endocrinology* 142 (7): 2978-84. <https://doi.org/10.1210/endo.142.7.8244>.
- 228.Javitt, Norman B, Young C Lee, Chikara Shimizu, Hirotooshi Fuda, et Charles A Strott. 2001. « Cholesterol and Hydroxycholesterol Sulfotransferases: Identification, Distinction from Dehydroepiandrosterone Sulfotransferase, and Differential Tissue Expression » 142 (7).
- 229.Jaye, Michael C., John A. Krawiec, Nino Campobasso, Angela Smallwood, Chunyan Qiu, Quinn Lu, John J. Kerrigan, et al. 2005. « Discovery of Substituted Maleimides as Liver X Receptor Agonists and Determination of a Ligand-Bound Crystal Structure ». *Journal of Medicinal Chemistry* 48 (17): 5419-22. <https://doi.org/10.1021/jm050532w>.
- 230.Jensen, Elwood V., et V. Craig Jordan. 2003. « The Estrogen Receptor: A Model for Molecular Medicine ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 9 (6): 1980-89.
- 231.Johansson, Ann-Sofie, et Bengt Mannervik. 2001. « Human Glutathione Transferase A3-3, a Highly Efficient Catalyst of Double-Bond Isomerization in the Biosynthetic Pathway of Steroid Hormones ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (35): 33061-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104539200>.
- 232.Ann-Sofie Johansson, Bengt Mannervik. 2002. « Active-Site Residues Governing High Steroid Isomerase Activity in Human Glutathione Transferase A3-3 ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (19): 16648-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201062200>.
- 233.Johnson, K A. 1994. « In Vivo Formation of 25-Hydroxycholesterol from Endogenous Cholesterol after a Single Meal, Dietary Cholesterol Challenge. » *Journal of lipid research* vol. 35,12 (1994): 2241-53. PMID: 7897321
- 234.Jordan, V. Craig. 2003. « Tamoxifen: A Most Unlikely Pioneering Medicine ». *Nature Reviews Drug Discovery* 2 (3): 205-13. <https://doi.org/10.1038/nrd1031>.
- 235.Jozan, S., B. Kreitmann, et F. Bayard. 1981. « Different effects of oestradiol, oestriol, oestetrol and of oestrone on human breast cancer cells (MCF-7) in long term tissue culture ». *Acta Endocrinologica* 98 (1): 73-80. <https://doi.org/10.1530/acta.0.0980073>.
- 236.Kandutsch, A.A., et A.E. Russell. 1960. « Preputial Gland Tumor Sterols ». *Journal of Biological Chemistry* 235 (8): 2256-61. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64608-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64608-3).
- 237.Kasarinaite, Alvile, Matthew Sinton, Philippa T. K. Saunders, et David C. Hay. 2023. « The Influence of Sex Hormones in Liver Function and Disease ». *Cells* 12 (12): 1604. <https://doi.org/10.3390/cells12121604>.
- 238.Kedjouar, Blandine, Philippe De Médina, Mustapha Oulad-Abdelghani, Bruno Payré, Sandrine Silvente-Poirot, Gilles Favre, Jean-Charles Faye, et Marc Poirot. 2004. « Molecular Characterization of the Microsomal Tamoxifen Binding Site ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (32): 34048-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405230200>.
- 239.Kelley, R. I. 2000. « The Smith-Lemli-Opitz syndrome ». *Journal of Medical Genetics* 37 (5): 321-35. <https://doi.org/10.1136/jmg.37.5.321>.
- 240.Kelley, Richard I., William G. Wilcox, Moyra Smith, Lisa E. Kratz, Ann Moser, et David S. Rimoin. 1999. « Abnormal Sterol Metabolism in Patients with Conradi-Hünermann-Happle Syndrome and Sporadic Lethal Chondrodysplasia Punctata ». *American Journal of Medical Genetics* 83 (3): 213-19. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-8628\(19990319\)83:3<213::AID-AJMG15>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19990319)83:3<213::AID-AJMG15>3.0.CO;2-C).
- 241.Kennedy, Matthew A., Gabriel C. Barrera, Kotoka Nakamura, Ángel Baldán, Paul Tarr, Michael C. Fishbein, Joy Frank, Omar L. Francone, et Peter A. Edwards. 2005. « ABCG1 Has a Critical Role in Mediating Cholesterol Efflux to HDL and Preventing Cellular Lipid Accumulation ». *Cell Metabolism* 1 (2): 121-31. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.01.002>.

242. Kha, Hoa Ton, Benjamin Basseri, Daniel Shouhed, Jennifer Richardson, Sotirios Tetradis, Theodore J Hahn, et Farhad Parhami. 2004. « Oxysterols Regulate Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Pro-Bone and Anti-Fat ». *Journal of Bone and Mineral Research* 19 (5): 830-40. <https://doi.org/10.1359/jbmr.040115>.
243. Kikuchi, Shintaro, Yoshio Imai, Suzuoki-Ziro, Takao Matsuo, et Shunsaku Noguchi. 1968. « BIOLOGIC STUDIES OF CHOLESTANE-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -TRIOL AND ITS DERIVATIVES. III. THE METABOLIC FATE AND METABOLITES OF CHOLESTANE-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -TRIOL IN ANIMALS ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 159 (2): 399.
244. Kimbung, Siker, Maria Inasu, Tor Stålhammar, Björn Nodin, Karin Elebro, Helga Tryggvadottir, Maria Ygland Rödström, et al. 2020. « CYP27A1 Expression Is Associated with Risk of Late Lethal Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer in Postmenopausal Patients ». *Breast Cancer Research* 22 (1): 123. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01347-x>.
245. Kiriya, Yoshimitsu, et Hiromi Nochi. 2019. « The Biosynthesis, Signaling, and Neurological Functions of Bile Acids ». *Biomolecules* 9 (6): 232. <https://doi.org/10.3390/biom9060232>.
246. Kong, Kwang-Hoon, Kazuo Takasu, Hideshi Inoue, et Kenji Takahashi. 1992. « Tyrosine-7 in Human Class Pi Glutathione S-Transferase Is Important for Lowering the pKa of the Thiol Group of Glutathione in the Enzyme-Glutathione Complex ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 184 (1): 194-97. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(92\)91177-R](https://doi.org/10.1016/0006-291X(92)91177-R).
247. Koskinen, Mikko, et Kamila Plná. 2000. « Specific DNA Adducts Induced by Some Mono-Substituted Epoxides in Vitro and in Vivo ». *Chemico-Biological Interactions* 129 (3): 209-29. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(00\)00206-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(00)00206-4).
248. Kostyal, D., R. S. Welt, J. Danko, T. Shay, C. Lanning, K. Horton, et S. Welt. 2012. « Trastuzumab and Lapatinib Modulation of HER2 Tyrosine/Threonine Phosphorylation and Cell Signaling ». *Medical Oncology* 29 (3): 1486-94. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-0025-7>.
249. Kovacs, Werner J, Lisa M Olivier, et Skaidrite K Krisans. 2002. « Central Role of Peroxisomes in Isoprenoid Biosynthesis ». *Progress in Lipid Research* 41 (5): 369-91. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00002-4).
250. Kovacs, Werner J., Khanichi N. Tape, Janis E. Shackelford, Xueying Duan, Takhar Kasumov, Joanne K. Kelleher, Henri Brunengraber, et Skaidrite K. Krisans. 2007. « Localization of the Pre-Squalene Segment of the Isoprenoid Biosynthetic Pathway in Mammalian Peroxisomes ». *Histochemistry and Cell Biology* 127 (3): 273-90. <https://doi.org/10.1007/s00418-006-0254-6>.
251. Kubo, Isao, Michael J. Pettei, Ken Hirotsu, Hideyuki Tsuji, et Takashi Kubota. 1978. « Structure of Shikodonin, a Unique Anti-Tumor Spirosecokaurane Diterpenoid ». *Journal of the American Chemical Society* 100 (2): 628-30. <https://doi.org/10.1021/ja00470a047>.
252. Kuiper, G G, E Enmark, M Peltö-Huikko, S Nilsson, et J A Gustafsson. 1996. « Cloning of a Novel Receptor Expressed in Rat Prostate and Ovary. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (12): 5925-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5925>.
253. Laffitte, Bryan A., Sean B. Joseph, Mingyi Chen, Antonio Castrillo, Joyce Repa, Damien Wilpitz, David Mangelsdorf, et Peter Tontonoz. 2003. « The Phospholipid Transfer Protein Gene Is a Liver X Receptor Target Expressed by Macrophages in Atherosclerotic Lesions ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (6): 2182-91. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.6.2182-2191.2003>.
254. Laffitte, Bryan A, Joyce J Repa, Sean B Joseph, Damien C Wilpitz, Heidi R Kast, David J Mangelsdorf, et Peter Tontonoz. s. d. « LXRs Control Lipid-Inducible Expression of the Apolipoprotein E Gene in Macrophages and Adipocytes ». *CELL BIOLOGY*.
255. Larsson, Hanna, Ylva Böttiger, Luigi Iuliano, et Ulf Diczfalussy. 2007. « In Vivo Interconversion of 7 $\beta$ -Hydroxycholesterol and 7-Ketocholesterol, Potential Surrogate Markers for Oxidative Stress ». *Free Radical Biology and Medicine* 43 (5): 695-701. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.033>.
256. Lee, Joo Hee, D. W. Shoeman, Song-Suk Kim, et A. Saari Csallany. 1997. « The Effect of Superoxide Anion in the Production of Seven Major Cholesterol Oxidation Products in Aprotic and Protic Conditions ». *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 48 (2): 151-59. <https://doi.org/10.3109/09637489709006975>.



257. Lee, YoungJoo, et Jack Gorski. 1996. « Estrogen-Induced Transcription of the Progesterone Receptor Gene Does Not Parallel Estrogen Receptor Occupancy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (26): 15180-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15180>.
258. Lehmann, Jürgen M., Steven A. Kliewer, Linda B. Moore, Tracey A. Smith-Oliver, Beverly B. Oliver, Jui-Lan Su, Scott S. Sundseth, et al. 1997. « Activation of the Nuclear Receptor LXR by Oxysterols Defines a New Hormone Response Pathway ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (6): 3137-40. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.6.3137>.
259. Leignadier J, Dalenc F, Poirot M, Silvente-Poirot S. Improving the efficacy of hormone therapy in breast cancer: The role of cholesterol metabolism in SERM-mediated autophagy, cell differentiation and death. *Biochem Pharmacol*. 2017 Nov 15;144:18-28. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.06.120>.
260. Liang, Jing, et Yongfeng Shang. 2013. « Estrogen and Cancer ». *Annual Review of Physiology* 75 (1): 225-40. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183708>.
261. Lieberman, Phil. 2011. « The Basics of Histamine Biology ». *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 106 (2): S2-5. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2010.08.005>.
262. Li-Hawkins, Jia, Erik G. Lund, Amy D. Bronson, et David W. Russell. 2000. « Expression Cloning of an Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase Selective for 24-Hydroxycholesterol ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (22): 16543-49. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001810200>.
263. Lin, Ching-Yu, Chieh Huo, Li-Kuo Kuo, Richard A. Hiipakka, Richard Baker Jones, Hui-Ping Lin, Yuwen Hung, et al. 2013. « Cholestane-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -Triol Suppresses Proliferation, Migration, and Invasion of Human Prostate Cancer Cells ». Édité par Zoran Culig. *PLoS ONE* 8 (6): e65734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065734>.
264. Lin, Ying Yong, Margaret Welch, et Seymour Lieberman. 2003. « The Detection of 20(S)-Hydroxycholesterol in Extracts of Rat Brains and Human Placenta by a Gas Chromatograph/Mass Spectrometry Technique ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 85 (1): 57-61. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(03\)00137-7](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(03)00137-7).
265. Lingwood, Daniel, et Kai Simons. 2010. « Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle ». *Science* 327 (5961): 46-50. <https://doi.org/10.1126/science.1174621>.
266. Liu, Changlu, Xia V. Yang, Jiejun Wu, Chester Kuei, Neelakandha S. Mani, Li Zhang, Jingxue Yu, et al. 2011. « Oxysterols Direct B-Cell Migration through EB12 ». *Nature* 475 (7357): 519-23. <https://doi.org/10.1038/nature10226>.
267. Liu, Hongmei, Lan Yuan, Shanjin Xu, Kui Wang, et Tianlan Zhang. 2005. « Cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol Inhibits Osteoblastic Differentiation and Promotes Apoptosis of Rat Bone Marrow Stromal Cells ». *Journal of Cellular Biochemistry* 96 (1): 198-208. <https://doi.org/10.1002/jcb.20510>.
268. Liu, Hongmei, Lan Yuan, Shanjin Xu, Tianlan Zhang, et Kui Wang. 2004. « Cholestane-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -Triol Promotes Vascular Smooth Muscle Cells Calcification ». *Life Sciences* 76 (5): 533-43. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.06.025>.
269. Liu, Su-Yang, Roghiyh Aliyari, Kelechi Chikere, Guangming Li, Matthew D. Marsden, Jennifer K. Smith, Olivier Pernet, et al. 2013. « Interferon-Inducible Cholesterol-25-Hydroxylase Broadly Inhibits Viral Entry by Production of 25-Hydroxycholesterol ». *Immunity* 38 (1): 92-105. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.005>.
270. Liu, Yongxiang, Zifeng Wang, Huan Jin, Lei Cui, Bitao Huo, Chunyuan Xie, Jiahui Li, et al. 2024. « Squalene-Epoxidase-Catalyzed 24(S),25-Epoxycholesterol Synthesis Promotes Trained-Immunity-Mediated Antitumor Activity ». *Cell Reports* 43 (4): 114094. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114094>.
271. Llaverias, Gemma, Christiane Danilo, Isabelle Mercier, Kristin Daumer, Franco Capozza, Terence M. Williams, Federica Sotgia, Michael P. Lisanti, et Philippe G. Frank. 2011. « Role of Cholesterol in the Development and Progression of Breast Cancer ». *The American Journal of Pathology* 178 (1): 402-12. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.005>.
272. Lo, Wan-Bang, et Homer S. Black. 1973. « Inhibition of Carcinogen Formation in Skin Irradiated with Ultraviolet Light ». *Nature* 246 (5434): 489-91. <https://doi.org/10.1038/246489a0>.

273. Long, Tao, Erik W. Debler, et Xiaochun Li. 2022. « Structural Enzymology of Cholesterol Biosynthesis and Storage ». *Current Opinion in Structural Biology* 74 (juin):102369. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102369>.
274. Loosfelt, H, M Atger, M Misrahi, A Guiochon-Mantel, C Meriel, F Logeat, R Benarous, et E Milgrom. 1986. « Cloning and Sequence Analysis of Rabbit Progesterone-Receptor Complementary DNA. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83 (23): 9045-49. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.23.9045>.
275. Lord, C., S. Ferro-Novick, et E. A. Miller. 2013. « The Highly Conserved COPII Coat Complex Sorts Cargo from the Endoplasmic Reticulum and Targets It to the Golgi ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (2): a013367-a013367. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013367>.
276. Lu, Da-Lin, Charlotte Le Cornet, Disorn Sookthai, Theron S Johnson, Rudolf Kaaks, et Renée T Fortner. 2019. « Circulating 27-Hydroxycholesterol and Breast Cancer Risk: Results From the EPIC-Heidelberg Cohort ». *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 111 (4): 365-71. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy115>.
277. Lu, Fuxin, Donna M. Ferriero, et Xiangning Jiang. 2022. « Cholesterol in Brain Development and Perinatal Brain Injury: More Than a Building Block ». *Current Neuropharmacology* 20 (7): 1400-1412. <https://doi.org/10.2174/1570159X19666211111122311>.
278. Lund, E, U Diczfalusy, et I Björkhem. 1992. « On the Mechanism of Oxidation of Cholesterol at C-7 in a Lipoyxygenase System. » *Journal of Biological Chemistry* 267 (18): 12462-67. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42299-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42299-5).
279. Lund, Erik, Ingemar Björkhem, Catrin Furster, et Kjell Wikvall. 1993. « 24-, 25- and 27-Hydroxylation of Cholesterol by a Purified Preparation of 27-Hydroxylase from Pig Liver ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1166 (2-3): 177-82. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(93\)90094-P](https://doi.org/10.1016/0005-2760(93)90094-P).
280. Lund, Erik G., Joseph M. Guileyardo, et David W. Russell. 1998. « cDNA Cloning of Cholesterol 24-Hydroxylase, a Mediator of Cholesterol Homeostasis in the Brain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (13): 7238-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.13.7238>.
281. Lund, Erik G., Thomas A. Kerr, Juro Sakai, Wei-Ping Li, et David W. Russell. 1998. « cDNA Cloning of Mouse and Human Cholesterol 25-Hydroxylases, Polytopic Membrane Proteins That Synthesize a Potent Oxysterol Regulator of Lipid Metabolism ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (51): 34316-27. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.51.34316>.
282. Lund-Katz, Sissel, et Michael C. Phillips. 2010. « High Density Lipoprotein Structure–Function and Role in Reverse Cholesterol Transport ». In *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins*., édité par J. Robin Harris, 51:183-227. Subcellular Biochemistry. Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-8622-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-90-481-8622-8_7).
283. Luo, Jie, Luyi Jiang, Hongyuan Yang, et Bao-Liang Song. 2017. « Routes and Mechanisms of Post-endosomal Cholesterol Trafficking: A Story That Never Ends ». *Traffic* 18 (4): 209-17. <https://doi.org/10.1111/tra.12471>.
284. Luo, Shaman, Gang Chen, Cristina I. Truica, Cynthia C. Baird, Zuping Xia, et Philip Lazarus. 2018. « Identification and Quantification of Novel Major Metabolites of the Steroidal Aromatase Inhibitor, Exemestane ». *Drug Metabolism and Disposition* 46 (12): 1867-78. <https://doi.org/10.1124/dmd.118.081166>.
285. Luo, Yi, et Alan R. Tall. 2000. « Sterol Upregulation of Human CETP Expression in Vitro and in Transgenic Mice by an LXR Element ». *Journal of Clinical Investigation* 105 (4): 513-20. <https://doi.org/10.1172/JCI8573>.
286. Lütjohann, Dieter, Olof Breuer, Gunvor Ahlborg, Inger Nennesmo, Åke Sidén, Ulf Diczfalusy, et Ingemar Björkhem. 1996. « Cholesterol Homeostasis in Human Brain: Evidence for an Age-Dependent Flux of 24S-Hydroxycholesterol from the Brain into the Circulation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (18): 9799-9804.
287. Ma, Yongjie, Leyuan Xu, Daniel Rodriguez-Agudo, Xiaobo Li, Douglas M. Heuman, Phillip B. Hylemon, William M. Pandak, et Shunlin Ren. 2008. « 25-Hydroxycholesterol-3-Sulfate Regulates Macrophage Lipid Metabolism via the LXR/SREBP-1 Signaling Pathway ». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 295 (6): E1369-79. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90555.2008>.



288. Maerker, G., et F. J. Bunick. 1986. « Cholesterol Oxides II. Measurement of the 5,6-epoxides during Cholesterol Oxidation in Aqueous Dispersions ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 63 (6): 771-77. <https://doi.org/10.1007/BF02541962>.
289. Mannervik, B, Y C Awasthi, P G Board, J D Hayes, C Di Ilio, B Ketterer, I Listowsky, et al. 1992. « Nomenclature for Human Glutathione Transferases ». *Biochemical Journal* 282 (1): 305-6. <https://doi.org/10.1042/bj2820305>.
290. Mannervik, Bengt, Philip G. Board, John D. Hayes, Irving Listowsky, et William R. Pearson. 2005. « Nomenclature for Mammalian Soluble Glutathione Transferases ». In *Methods in Enzymology*, 401:1-8. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01001-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01001-3).
291. Mano, Nariyasu, Yoshiaki Sato, Masanori Nagata, Takaaki Goto, et Junichi Goto. 2004. « Bioconversion of 3 $\beta$ -Hydroxy-5-Cholenoic Acid into Chenodeoxycholic Acid by Rat Brain Enzyme Systems ». *Journal of Lipid Research* 45 (9): 1741-48. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400157-JLR200>.
292. Martin, Charles M., et Harold J. Nicholas. 1973. « Metabolism of Cholesteryl Palmitate by Rat Brain in Vitro; Formation of Cholesterol Epoxides and Cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -Triol ». *Journal of Lipid Research* 14 (6): 618-24. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)36842-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)36842-5).
293. Massey, John B. 2006. « Membrane and Protein Interactions of Oxysterols ». *Current Opinion in Lipidology* 17 (3): 296-301. <https://doi.org/10.1097/01.mol.0000226123.17629.ab>.
294. Matthias, D, C.-H Becker, W Gödicke, R Schmidt, et K Ponsold. 1987. « Action of Cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -Triol on Rats with Particular Reference to the Aorta ». *Atherosclerosis* 63 (2-3): 115-24. [https://doi.org/10.1016/0021-9150\(87\)90111-0](https://doi.org/10.1016/0021-9150(87)90111-0).
295. Mazein, Alexander, Steven Watterson, Wei-Yuan Hsieh, William J. Griffiths, et Peter Ghazal. 2013. « A Comprehensive Machine-Readable View of the Mammalian Cholesterol Biosynthesis Pathway ». *Biochemical Pharmacology* 86 (1): 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.03.021>.
296. McNamara, D J, R Kolb, T S Parker, H Batwin, P Samuel, C D Brown, et E H Ahrens. 1987. « Heterogeneity of Cholesterol Homeostasis in Man. Response to Changes in Dietary Fat Quality and Cholesterol Quantity. » *Journal of Clinical Investigation* 79 (6): 1729-39. <https://doi.org/10.1172/JCI113013>.
297. Meaney, Steve, Amir Babiker, Dieter Lütjohann, Ulf Diczfalusy, Magnus Axelsson, et Ingemar Björkhem. 2003. « On the Origin of the Cholestenoic Acids in Human Circulation ». *Steroids* 68 (7-8): 595-601. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(03\)00081-3](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(03)00081-3).
298. Meister, Alton. 1995. « [1] Glutathione Metabolism ». In *Methods in Enzymology*, 251:3-7. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)51106-7](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)51106-7).
299. Meng, Yudong, Francesco Taddeo, Adriana Freitas Aguilera, Xiaoshuang Cai, Vincenzo Russo, Pasi Tolvanen, et Sébastien Leveneur. 2021. « The Lord of the Chemical Rings: Catalytic Synthesis of Important Industrial Epoxide Compounds ». *Catalysts* 11 (7): 765. <https://doi.org/10.3390/catal11070765>.
300. Menkes, John H. 1968. « Cerebrotendinous Xanthomatosis: The Storage of Cholesterol Within the Nervous System ». *Archives of Neurology* 19 (1): 47. <https://doi.org/10.1001/archneur.1968.00480010065004>.
301. Meyer, David J., et Brian Ketterer. 1982. « 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoxy-cholestan-3 $\beta$ -ol (Cholesterol A-oxide): A Specific Substrate for Rat Liver Glutathione Transferase B ». *FEBS Letters* 150 (2): 499-502. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)80798-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)80798-9).
302. Miao, E, S R Wilson, et N B Javitt. 1988. « Cholesterol Metabolism. Effect of 26-Thiacholesterol and 26-Aminocholesterol, Analogues of 26-Hydroxycholesterol, on Cholesterol Synthesis and Low-Density-Lipoprotein-Receptor Binding ». *Biochemical Journal* 255 (3): 1049-52. <https://doi.org/10.1042/bj2551049>.
303. Millard, Elizabeth E., Sarah E. Gale, Nicole Dudley, Jessie Zhang, Jean E. Schaffer, et Daniel S. Ory. 2005. « The Sterol-Sensing Domain of the Niemann-Pick C1 (NPC1) Protein Regulates Trafficking of Low Density Lipoprotein Cholesterol ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (31): 28581-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414024200>.
304. Miller, Walter L. 2013. « Steroid Hormone Synthesis in Mitochondria ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 379 (1-2): 62-73. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.014>.

305. Miller, Walter L., et Richard J. Auchus. 2011. « The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders ». *Endocrine Reviews* 32 (1): 81-151. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0013>.
306. Mitić, Tijana, Steven Shave, Nina Semjonous, Iain McNae, Diego F. Cobice, Gareth G. Lavery, Scott P. Webster, Patrick W.F. Hadoke, Brian R. Walker, et Ruth Andrew. 2013. « 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Contributes to the Balance between 7-Keto- and 7-Hydroxy-Oxysterols in Vivo ». *Biochemical Pharmacology* 86 (1): 146-53. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.002>.
307. Mitro, Nico, Puiying A. Mak, Leo Vargas, Cristina Godio, Eric Hampton, Valentina Molteni, Andreas Kreusch, et Enrique Saez. 2007. « The Nuclear Receptor LXR Is a Glucose Sensor ». *Nature* 445 (7124): 219-23. <https://doi.org/10.1038/nature05449>.
308. Mitro, Nico, Leo Vargas, Russell Romeo, Alan Koder, et Enrique Saez. 2007. « T0901317 Is a Potent PXR Ligand: Implications for the Biology Ascribed to LXR ». *FEBS Letters* 581 (9): 1721-26. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.047>.
309. Mitsche, Matthew A, Jeffrey G McDonald, Helen H Hobbs, et Jonathan C Cohen. 2015. « Flux Analysis of Cholesterol Biosynthesis in Vivo Reveals Multiple Tissue and Cell-Type Specific Pathways ». *eLife* 4 (juin): e07999. <https://doi.org/10.7554/eLife.07999>.
310. Mohana, Krishnamoorthy, et Anant Achary. 2017. « Human Cytosolic Glutathione-S-Transferases: Quantitative Analysis of Expression, Comparative Analysis of Structures and Inhibition Strategies of Isozymes Involved in Drug Resistance ». *Drug Metabolism Reviews* 49 (3): 318-37. <https://doi.org/10.1080/03602532.2017.1343343>.
311. Mohanty, Ipsita, Helena Mannocho-Russo, Joshua V. Schweer, Yasin El Abiead, Wout Bittremieux, Shipai Xing, Robin Schmid, et al. 2024. « The Underappreciated Diversity of Bile Acid Modifications ». *Cell* 187 (7): 1801-1818.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.02.019>.
312. Moldavski, Ofer, Peter-James H. Zushin, Charles A. Berdan, Robert J. Van Eijkeren, Xuntian Jiang, Mingxing Qian, Daniel S. Ory, et al. 2021. « 4 $\beta$ -Hydroxycholesterol Is a Prolipogenic Factor That Promotes SREBP1c Expression and Activity through the Liver X Receptor ». *Journal of Lipid Research* 62:100051. <https://doi.org/10.1016/j.jlcr.2021.100051>.
313. Mora, Anne-Sophie, Russell Tayouo, Bernard Boutevin, Ghislain David, et Sylvain Caillol. 2020. « A Perspective Approach on the Amine Reactivity and the Hydrogen Bonds Effect on Epoxy-Amine Systems ». *European Polymer Journal* 123 (janvier): 109460. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109460>.
314. Morisaki, Masuo, Mikio Shikita, et Nobuo Ikekawa. 1985. « [20] Side-Chain Cleavage of Cholesterol by Gas Chromatography-Mass Spectrometry in a Selected Ion Monitoring Mode ». In *Methods in Enzymology*, 111:352-64. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)11022-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)11022-0).
315. Morisseau, Christophe. 2013. « Role of Epoxide Hydrolases in Lipid Metabolism ». *Biochimie* 95 (1): 91-95. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.011>.
316. Moser, Bryan R., Steven C. Cermak, Kenneth M. Doll, James A. Kenar, et Brajendra K. Sharma. 2022. « A Review of Fatty Epoxide Ring Opening Reactions: Chemistry, Recent Advances, and Applications ». *Journal of the American Oil Chemists' Society* 99 (10): 801-42. <https://doi.org/10.1002/aocs.12623>.
317. Mosselman, Sietse, Jan Polman, et Rein Dijkema. 1996. « ER beta: Identification and Characterization of a Novel Human Estrogen Receptor ». *FEBS Letters*. 392,1 (1996): 49-53. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00782-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00782-x).
318. Mouchel, Pierre-Luc, Nizar Serhan, Rémy Betous, Thomas Farge, Estelle Saland, Philippe De Medina, Jean-Sébastien Hoffmann, et al. 2020. « Dendrogenin A Enhances Anti-Leukemic Effect of Anthracycline in Acute Myeloid Leukemia ». *Cancers* 12 (10): 2933. <https://doi.org/10.3390/cancers12102933>.
319. Mueller, Jonathan W., Lorna C. Gilligan, Jan Idkowiak, Wiebke Arlt, et Paul A. Foster. 2015. « The Regulation of Steroid Action by Sulfation and Desulfation ». *Endocrine Reviews* 36 (5): 526-63. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1036>.
320. Müller, Frank, Michael Arand, Heinz Frank, Albrecht Seidel, Willy Hinz, Lars Winkler, Karen Hänel, et al. 1997. « Visualization of a Covalent Intermediate between Microsomal Epoxide Hydrolase, but Not Cholesterol

- Epoxide Hydrolase, and Their Substrates ». *European Journal of Biochemistry* 245 (2): 490-96. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00490.x>.
321. Murphy, Christopher, Evelyne Deplazes, Charles G. Cranfield, et Alvaro Garcia. 2020. « The Role of Structure and Biophysical Properties in the Pleiotropic Effects of Statins ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (22): 8745. <https://doi.org/10.3390/ijms21228745>.
322. Murphy, P.R., W.C. Breckenridge, et C.B. Lazier. 1985. « Binding of Oxygenated Cholesterol Metabolites to Antiestrogen Binding Sites from Chicken Liver ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 127 (3): 786-92. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(85\)80012-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(85)80012-7).
323. Murphy, Robert C., et Kyle M. Johnson. 2008a. « Cholesterol, Reactive Oxygen Species, and the Formation of Biologically Active Mediators ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (23): 15521-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700049200>.
324. Robert C Murphy, Kyle M Johnson. 2008b. « Cholesterol, Reactive Oxygen Species, and the Formation of Biologically Active Mediators ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (23): 15521-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700049200>.
325. Mutemberezi, Valentin, Owein Guillemot-Legris, et Giulio G. Muccioli. 2016. « Oxysterols: From Cholesterol Metabolites to Key Mediators ». *Progress in Lipid Research* 64 (octobre):152-69. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.09.002>.
326. Nachtergaele, Sigrid, Laurel K Mydock, Kathiresan Krishnan, Jayan Rammohan, Paul H Schlesinger, Douglas F Covey, et Rajat Rohatgi. 2012. « Oxysterols Are Allosteric Activators of the Oncoprotein Smoothed ». *Nature Chemical Biology* 8 (2): 211-20. <https://doi.org/10.1038/nchembio.765>.
327. Nedelcu, Daniel, Jing Liu, Yangqing Xu, Cindy Jao, et Adrian Salic. 2013. « Oxysterol Binding to the Extracellular Domain of Smoothed in Hedgehog Signaling ». *Nature Chemical Biology* 9 (9): 557-64. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1290>.
328. Nelson, Erik R., Suzanne E. Wardell, Jeff S. Jasper, Sunghee Park, Sunil Suchindran, Matthew K. Howe, Nicole J. Carver, et al. 2013. « 27-Hydroxycholesterol Links Hypercholesterolemia and Breast Cancer Pathophysiology ». *Science* 342 (6162): 1094-98. <https://doi.org/10.1126/science.1241908>.
329. Nelson, J.A., S.R. Steckbeck, et T.A. Spencer. 1981. « Biosynthesis of 24,25-Epoxycholesterol from Squalene 2,3;22,23-Dioxide. » *Journal of Biological Chemistry* 256 (3): 1067-68. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69921-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69921-7).
330. Nes, W. David. 2011a. « Biosynthesis of Cholesterol and Other Sterols ». *Chemical Reviews* 111 (10): 6423-51. <https://doi.org/10.1021/cr200021m>.
331. W. David Nes. 2011b. « Biosynthesis of Cholesterol and Other Sterols ». *Chemical Reviews* 111 (10): 6423-51. <https://doi.org/10.1021/cr200021m>.
332. Newman, John W., Christophe Morisseau, et Bruce D. Hammock. 2005. « Epoxide Hydrolases: Their Roles and Interactions with Lipid Metabolism ». *Progress in Lipid Research* 44 (1): 1-51. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.10.001>.
333. Nie, Shuke, Guiqin Chen, Xuebing Cao, et Yunjian Zhang. 2014. « Cerebrotendinous Xanthomatosis: A Comprehensive Review of Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 9 (1): 179. <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0179-4>.
334. Nilsson, Stefan, Konrad F. Koehler, et Jan-Åke Gustafsson. 2011. « Development of Subtype-Selective Oestrogen Receptor-Based Therapeutics ». *Nature Reviews Drug Discovery* 10 (10): 778-92. <https://doi.org/10.1038/nrd3551>.
335. Noguer, Emmanuel, Régis Soules, Claude Netter, Citra Nagarathinam, Julie Leignadier, Emilie Huc-Claustre, Nizar Serhan, et al. 2017. « Quantitative Analysis of the Tumor Suppressor Dendrogenin A Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry ». *Chemistry and Physics of Lipids* 207 (octobre):81-86. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.06.010>.
336. Norlin, Maria, Anders Toll, Ingemar Björkhem, et Kjell Wikvall. 2000. « 24-Hydroxycholesterol Is a Substrate for Hepatic Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7A) ». *Journal of Lipid Research* 41 (10): 1629-39. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)31996-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)31996-9).

337. Norlin, Maria, Sara Von Bahr, Ingemar Björkhem, et Kjell Wikvall. 2003. « On the Substrate Specificity of Human CYP27A1 ». *Journal of Lipid Research* 44 (8): 1515-22. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300047-JLR200>.
338. Obr, Alison E., et Dean P. Edwards. 2012. « The Biology of Progesterone Receptor in the Normal Mammary Gland and in Breast Cancer ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 357 (1-2): 4-17. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.10.030>.
339. Oesch, F., C.W. Timms, C.H. Walker, T.M. Guenther, A. Sparrow, T. Watabe, et C.R. Wolf. 1984. « Existence of Multiple Forms of Microsomal Epoxide Hydrolases with Radically Different Substrate Specificities ». *Carcinogenesis* 5 (1): 7-9. <https://doi.org/10.1093/carcin/5.1.7>.
340. Oğuztüzün, Serpil, Mesude Işcan, Müzeyyen Özhavzali, et Serpil DiZbay Sak. 2009. « Comparison of GST Isoenzyme Expression in Normal and Neoplastic Breast Tissue: Correlation with Clinical and Prognostic Factors ». *Turkish Journal of Biology*, janvier. <https://doi.org/10.3906/biy-0808-12>.
341. Ohvo-Rekilä, H. 2002. « Cholesterol Interactions with Phospholipids in Membranes ». *Progress in Lipid Research* 41 (1): 66-97. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00020-0](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00020-0).
342. Olivier, Lisa M., Werner Kovacs, Kim Masuda, Gilbert-Andre Keller, et Skaidrite K. Krisans. 2000. « Identification of Peroxisomal Targeting Signals in Cholesterol Biosynthetic Enzymes: AA-CoA Thiolase, HMG-CoA Synthase, MPPD, and FPP Synthase ». *Journal of Lipid Research* 41 (12): 1921-35. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32353-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32353-1).
343. Olkkonen, Vesa M., et Riikka Hynynen. 2009. « Interactions of Oxysterols with Membranes and Proteins ». *Molecular Aspects of Medicine* 30 (3): 123-33. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.004>.
344. Tarekegn Geberhiwot, Alessandro Moro, Andrea Dardis, Uma Ramaswami, Sandra Sirrs, Mercedes Pineda Marfa, et al. 2018. « Consensus Clinical Management Guidelines for Niemann-Pick Disease Type C ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 13 (1): 50. <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0785-7>.
345. O'Neill, Kathleen L., Li-Wei Kuo, Michelle M. Williams, Hanne Lind, Lyndsey S. Crump, Nia G. Hammond, Nicole S. Spoelstra, M. Cecilia Caino, et Jennifer K. Richer. 2022. « NPC1 Confers Metabolic Flexibility in Triple Negative Breast Cancer ». *Cancers* 14 (14): 3543. <https://doi.org/10.3390/cancers14143543>.
346. Oram, John F., et Jay W. Heinecke. 2005. « ATP-Binding Cassette Transporter A1: A Cell Cholesterol Exporter That Protects Against Cardiovascular Disease ». *Physiological Reviews* 85 (4): 1343-72. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2005>.
347. Ortiz, J A, G Gil-Gómez, R P Casaroli-Marano, S Vilaró, F G Hegardt, et D Haro. 1994. « Transfection of the Ketogenic Mitochondrial 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Synthase cDNA into Mev-1 Cells Corrects Their Auxotrophy for Mevalonate ». *Journal of Biological Chemistry* 269 (46): 28523-26. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)61932-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)61932-0).
348. Ou, Jiafu, Hua Tu, Bei Shan, Alvin Luk, Russell A. DeBose-Boyd, Yuriy Bashmakov, Joseph L. Goldstein, et Michael S. Brown. 2001. « Unsaturated Fatty Acids Inhibit Transcription of the Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c (SREBP-1c) Gene by Antagonizing Ligand-Dependent Activation of the LXR ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (11): 6027-32. <https://doi.org/10.1073/pnas.111138698>.
349. Paik, Y K, J T Billheimer, R L Magolda, et J L Gaylor. 1986. « Microsomal Enzymes of Cholesterol Biosynthesis from Lanosterol. Solubilization and Purification of Steroid 8-Isomerase. » *Journal of Biological Chemistry* 261 (14): 6470-77. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84586-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84586-6).
350. Paillasse, Michael R., Nathalie Saffon, Heinz Gornitzka, Sandrine Silvente-Poirot, Marc Poirot, et Philippe De Medina. 2012. « Surprising Unreactivity of Cholesterol-5,6-Epoxides towards Nucleophiles ». *Journal of Lipid Research* 53 (4): 718-25. <https://doi.org/10.1194/jlr.M023689>.
351. Pajares, Sonia, Angela Arias, Judit García-Villoria, Judit Macías-Vidal, Emilio Ros, Javier De Las Heras, Marisa Girós, Maria J. Coll, et Antonia Ribes. 2015. « Cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -Triol: High Levels in Niemann-Pick Type C, Cerebrotendinous Xanthomatosis, and Lysosomal Acid Lipase Deficiency ». *Journal of Lipid Research* 56 (10): 1926-35. <https://doi.org/10.1194/jlr.M060343>.
352. Park, Kiwon, et Alan L Scott. 2010. « Cholesterol 25-Hydroxylase Production by Dendritic Cells and Macrophages Is Regulated by Type I Interferons ». *Journal of Leukocyte Biology* 88 (6): 1081-87. <https://doi.org/10.1189/jlb.0610318>.

353. Patil, Sachin P., et Bella R. Kuehn. 2024. « Discovery of Small Molecule Glycolytic Stimulants for Enhanced ApoE Lipidation in Alzheimer's Disease Cell Model ». *Pharmaceuticals* 17 (4): 491. <https://doi.org/10.3390/ph17040491>.
354. Payré, Bruno, Philippe De Medina, Nadia Boubekeur, Loubna Mhamdi, Justine Bertrand-Michel, François Tercé, Isabelle Fourquaux, et al. 2008. « Microsomal Antiestrogen-Binding Site Ligands Induce Growth Control and Differentiation of Human Breast Cancer Cells through the Modulation of Cholesterol Metabolism ». *Molecular Cancer Therapeutics* 7 (12): 3707-18. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0507>.
355. Pazin, Michael J, et James T Kadonaga. 1997. « What's Up and Down with Histone Deacetylation and Transcription? » *Cell* 89 (3): 325-28. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80211-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80211-1).
356. Peet, Daniel J, Bethany A Janowski, et David J Mangelsdorf. 1998a. « The LXRs: A New Class of Oxysterol Receptors ». *Current Opinion in Genetics & Development* 8 (5): 571-75. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(98\)80013-0](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(98)80013-0).
357. Peet, Daniel J, Stephen D Turley, Wenzhen Ma, Bethany A Janowski, Jean-Marc A Lobaccaro, Robert E Hammer, et David J Mangelsdorf. 1998. « Cholesterol and Bile Acid Metabolism Are Impaired in Mice Lacking the Nuclear Oxysterol Receptor LXR $\alpha$  ». *Cell* 93 (5): 693-704. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81432-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81432-4).
358. Perou, Charles M., Therese Sørbye, Michael B. Eisen, Matt Van De Rijn, Stefanie S. Jeffrey, Christian A. Rees, Jonathan R. Pollack, et al. 2000. « Molecular Portraits of Human Breast Tumours ». *Nature* 406 (6797): 747-52. <https://doi.org/10.1038/35021093>.
359. Peterson, A.R., H. Peterson, C.P. Spears, J.E. Trosko, et A. Sevanian. 1988. « Mutagenic Characterization of Cholesterol Epoxides in Chinese Hamster V79 Cells ». *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 203 (5): 355-66. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(88\)90032-5](https://doi.org/10.1016/0165-1161(88)90032-5).
360. Petrović, Zoran S., Alisa Zlatanić, Charlene C. Lava, et Snežana Sinadinović-Fišer. 2002. « Epoxidation of Soybean Oil in Toluene with Peroxoacetic and Peroxoformic Acids— Kinetics and Side Reactions ». *European Journal of Lipid Science and Technology* 104 (5): 293-99. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200205\)104:5<293::AID-EJLT293>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200205)104:5<293::AID-EJLT293>3.0.CO;2-W).
361. Pettersson, Pär L., et Bengt Mannervik. 2001. « The Role of Glutathione in the Isomerization of  $\Delta^5$ -Androstene-3,17-Dione Catalyzed by Human Glutathione Transferase A1-1 ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (15): 11698-704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009146200>.
362. Pickard, Robert Howson, et Joseph Yates. 1908. « CLXIV.—Contributions to the Chemistry of the Cholesterol Group. Part I. The Action of Hydrogen Peroxide and of Fused Potassium Hydroxide on Cholesterol ». *J. Chem. Soc., Trans.* 93 (0): 1678-87. <https://doi.org/10.1039/CT9089301678>.
363. Pincinato, Eder De Carvalho, Patricia Moriel, et Dulcinéia Saes Parra Abdalla. 2009. « Cholesterol Oxides Inhibit Cholesterol Esterification by Lecithin: Cholesterol Acyl Transferase ». *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 45 (3): 429-35. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000300007>.
364. Poirot, Marc, Philippe De Medina, Frederic Delarue, Jean-Jacques Perie, Alain Klæbe, et Jean-Charles Faye. 2000. « Synthesis, Binding and Structure-Activity Studies of New Ligands for the Microsomal Anti-Estrogen Binding Site (AEBS) ». *Bioorg. Med. Chem.*
365. Poirot, Marc, et Sandrine Silvente-Poirot. 2013a. « Cholesterol-5,6-Epoxides: Chemistry, Biochemistry, Metabolic Fate and Cancer ». *Biochimie* 95 (3): 622-31. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.05.006>.
366. Poirot, Marc, et Sandrine Silvente-Poirot. 2018. « The Tumor-Suppressor Cholesterol Metabolite, Dendrogenin A, Is a New Class of LXR Modulator Activating Lethal Autophagy in Cancers ». *Biochemical Pharmacology* 153 (juillet): 75-81. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.046>.
367. Poirot, Marc, Régis Soules, Arnaud Mallinger, Florence Dalenc, et Sandrine Silvente-Poirot. 2018. « Chemistry, Biochemistry, Metabolic Fate and Mechanism of Action of 6-Oxo-Cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -Diol (OCDO), a Tumor Promoter and Cholesterol Metabolite ». *Biochimie* 153 (octobre): 139-49. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.04.008>.
368. Poli, Giuseppe, Fiorella Biasi, et Gabriella Leonarduzzi. 2013. « Oxysterols in the Pathogenesis of Major Chronic Diseases ». *Redox Biology* 1 (1): 125-30. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.12.001>.



369. Popjak, George, John Edmond, Frank A. L. Anet, et N. Roy Easton. 1977. « Carbon-13 NMR Studies on Cholesterol Biosynthesized from [13C]Mevalonates ». *Journal of the American Chemical Society* 99 (3): 931-35. <https://doi.org/10.1021/ja00445a041>.
370. Porter, Forbes D., et Gail E. Herman. 2011. « Malformation Syndromes Caused by Disorders of Cholesterol Synthesis ». *Journal of Lipid Research* 52 (1): 6-34. <https://doi.org/10.1194/jlr.R009548>.
371. Porter, Forbes D., David E. Scherrer, Michael H. Lanier, S. Joshua Langmade, Vasumathi Molugu, Sarah E. Gale, Dana Olzeski, et al. 2010. « Cholesterol Oxidation Products Are Sensitive and Specific Blood-Based Biomarkers for Niemann-Pick C1 Disease ». *Science Translational Medicine* 2 (56). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001417>.
372. Porter, T.D., et M.J. Coon. 1991. « Cytochrome P-450. Multiplicity of Isoforms, Substrates, and Catalytic and Regulatory Mechanisms ». *Journal of Biological Chemistry* 266 (21): 13469-72. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)92717-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)92717-1).
373. Prabhu, Anika V., Winnie Luu, Laura J. Sharpe, et Andrew J. Brown. 2016. « Cholesterol-Mediated Degradation of 7-Dehydrocholesterol Reductase Switches the Balance from Cholesterol to Vitamin D Synthesis ». *Journal of Biological Chemistry* 291 (16): 8363-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.699546>.
374. Prah, Jude, Ali Winters, Kiran Chaudhari, Jessica Hersh, Ran Liu, et Shao-Hua Yang. 2019. « Cholesterol Sulfate Alters Astrocyte Metabolism and Provides Protection against Oxidative Stress ». *Brain Research* 1723 (novembre): 146378. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146378>.
375. Preuss, Inga, Marie-Gabrielle Ludwig, Birgit Baumgarten, Frederic Bassilana, Francois Gessier, Klaus Seuwen, et Andreas W. Sailer. 2014. « Transcriptional Regulation and Functional Characterization of the Oxysterol/EBI2 System in Primary Human Macrophages ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446 (3): 663-68. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.069>.
376. Prileschajew, Nikolaus. 1909. « Oxydation ungesättigter Verbindungen mittels organischer Superoxyde ». *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 42 (4): 4811-15. <https://doi.org/10.1002/cber.190904204100>.
377. Puigserver, Pere, Guillaume Adelmant, Zhidan Wu, Melina Fan, Jianming Xu, Bert O'Malley, et Bruce M. Spiegelman. 1999. « Activation of PPAR $\gamma$  Coactivator-1 Through Transcription Factor Docking ». *Science* 286 (5443): 1368-71. <https://doi.org/10.1126/science.286.5443.1368>.
378. Pui-Kai Li, Radhakrishnan Pillai, Barry L. Young, William H. Bender, Dino M. Martino, et Fu-Tyan Lin. 1993. « Synthesis and Biochemical Studies of Estrone Sulfatase Inhibitors ». *Steroids* 58 (3): 106-11. [https://doi.org/10.1016/0039-128X\(93\)90045-O](https://doi.org/10.1016/0039-128X(93)90045-O).
379. Pulfer, Melissa K., et Robert C. Murphy. 2004. « Formation of Biologically Active Oxysterols during Ozonolysis of Cholesterol Present in Lung Surfactant ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (25): 26331-38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403581200>.
380. Putti, Thomas C, Dalia M Abd El-Rehim, Emad A Rakha, Claire E Paish, Andrew Hs Lee, Sarah E Pinder, et Ian O Ellis. 2005. « Estrogen Receptor-Negative Breast Carcinomas: A Review of Morphology and Immunophenotypical Analysis ». *Modern Pathology* 18 (1): 26-35. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800255>.
381. Qiu, Zhi-Ping, Ao Hu, et Bao-Liang Song. 2021. « The 3-Beta-Hydroxysteroid-Delta(8), Delta(7)-Isomerase EBP Inhibits Cholesterylization of Smoothed ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1866 (12): 159041. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2021.159041>.
382. Quinet, Elaine M., Michael D. Basso, Anita R. Halpern, David W. Yates, Robert J. Steffan, Valerie Clerin, Christine Resmini, et al. 2009. « LXR Ligand Lowers LDL Cholesterol in Primates, Is Lipid Neutral in Hamster, and Reduces Atherosclerosis in Mouse ». *Journal of Lipid Research* 50 (12): 2358-70. <https://doi.org/10.1194/jlr.M900037-JLR200>.
383. Radhakrishnan, Arun, Joseph L. Goldstein, Jeffrey G. McDonald, et Michael S. Brown. 2008. « Switch-like Control of SREBP-2 Transport Triggered by Small Changes in ER Cholesterol: A Delicate Balance ». *Cell Metabolism* 8 (6): 512-21. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.10.008>.
384. Radhakrishnan, Arun, Yukio Ikeda, Hyock Joo Kwon, Michael S. Brown, et Joseph L. Goldstein. 2007. « Sterol-Regulated Transport of SREBPs from Endoplasmic Reticulum to Golgi: Oxysterols Block Transport by Binding



- to Insig ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (16): 6511-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700899104>.
385. Rakha, Emad A., Maysa E. El-Sayed, Andrew R. Green, E. Claire Paish, Desmond G. Powe, Julia Gee, Robert I. Nicholson, Andrew H.S. Lee, John F.R. Robertson, et Ian O. Ellis. 2007. « Biologic and Clinical Characteristics of Breast Cancer With Single Hormone Receptor–Positive Phenotype ». *Journal of Clinical Oncology* 25 (30): 4772-78. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.12.2747>.
  386. Rakha, Emad A., Jorge S. Reis-Filho, et Ian O. Ellis. 2010. « Combinatorial Biomarker Expression in Breast Cancer ». *Breast Cancer Research and Treatment* 120 (2): 293-308. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0746-x>.
  387. Raleigh, David R., Navdar Sever, Pervinder K. Choksi, Monika Abedin Sigg, Kelly M. Hines, Bonne M. Thompson, Daniel Elnatan, et al. 2018. « Cilia-Associated Oxysterols Activate Smoothed ». *Molecular Cell* 72 (2): 316-327.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.034>.
  388. Ravdin, P M, S Green, T M Dorr, W L McGuire, C Fabian, R P Pugh, R D Carter, S E Rivkin, J R Borst, et R J Belt. 1992. « Prognostic Significance of Progesterone Receptor Levels in Estrogen Receptor-Positive Patients with Metastatic Breast Cancer Treated with Tamoxifen: Results of a Prospective Southwest Oncology Group Study. » *Journal of Clinical Oncology* 10 (8): 1284-91. <https://doi.org/10.1200/JCO.1992.10.8.1284>.
  389. Rebek, J., L. Marshall, J. McManis, et R. Wolak. 1986. « Convergent Functional Groups. 2. Structure and Selectivity in Olefin Epoxidation with Peracids ». *The Journal of Organic Chemistry* 51 (10): 1649-53. <https://doi.org/10.1021/jo00360a003>.
  390. Reboldi, Andrea, Eric V. Dang, Jeffrey G. McDonald, Guosheng Liang, David W. Russell, et Jason G. Cyster. 2014. « 25-Hydroxycholesterol Suppresses Interleukin-1–Driven Inflammation Downstream of Type I Interferon ». *Science* 345 (6197): 679-84. <https://doi.org/10.1126/science.1254790>.
  391. Record, Michel, Mehdi Attia, Kevin Carayon, Laly Pucheu, Julio Bunay, Régis Soulès, Silia Ayadi, et al. 2022. « Targeting the Liver X Receptor with Dendrogenin A Differentiates Tumour Cells to Secrete Immunogenic Exosome-enriched Vesicles ». *Journal of Extracellular Vesicles* 11 (4): e12211. <https://doi.org/10.1002/jev2.12211>.
  392. Reddy, Jonathan V., Ian G. Ganley, et Suzanne R. Pfeffer. 2006. « Clues to Neuro-Degeneration in Niemann-Pick Type C Disease from Global Gene Expression Profiling ». Édité par Winston Hide. *PLoS ONE* 1 (1): e19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000019>.
  393. Redel, Joseph. 1979. « Configuration at C-25 and Stereochemical Purity of 26-Hydroxycholesterol of Natural Origin ». *Journal of Chromatography A* 168 (1): 273-76. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)80724-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)80724-4).
  394. Reed, M. J., A. Purohit, L. W. L. Woo, S. P. Newman, et B. V. L. Potter. 2005. « Steroid Sulfatase: Molecular Biology, Regulation, and Inhibition ». *Endocrine Reviews* 26 (2): 171-202. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0003>.
  395. Ren, Shunlin, Jin Koungh Kim, Genta Kakiyama, Daniel Rodriguez-Agudo, William M. Pandak, Hae-Ki Min, et Yanxia Ning. 2014. « Identification of Novel Regulatory Cholesterol Metabolite, 5-Cholesten, 3 $\beta$ ,25-Diol, Disulfate ». Édité par Mengwei Zang. *PLoS ONE* 9 (7): e103621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103621>.
  396. Ren, Shunlin, Xiaobo Li, Daniel Rodriguez-Agudo, Gregorio Gil, Phillip Hylemon, et William M. Pandak. 2007. « Sulfated Oxysterol, 25HC3S, Is a Potent Regulator of Lipid Metabolism in Human Hepatocytes ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360 (4): 802-8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.143>.
  397. Repa, J. J., S. D. Turley, J.-M. A. Lobaccaro, J. Medina, L. Li, K. Lustig, B. Shan, R. A. Heyman, J. M. Dietschy, et D. J. Mangelsdorf. 2000. « Regulation of Absorption and ABC1-Mediated Efflux of Cholesterol by RXR Heterodimers ». *Science* 289 (5484): 1524-29. <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1524>.
  398. Repa, Joyce J., et David J. Mangelsdorf. 2000. « The Role of Orphan Nuclear Receptors in the Regulation of Cholesterol Homeostasis ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16 (1): 459-81. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.459>.
  399. Repa, Joyce J., et David J. Mangelsdorf. 2002. « The Liver X Receptor Gene Team: Potential New Players in Atherosclerosis ». *Nature Medicine* 8 (11): 1243-48. <https://doi.org/10.1038/nm1102-1243>.

400. Reyat, Fabien, David Hajage, Alexia Savignoni, Jean-Guillaume Feron, Marc Andrew Bollet, Youlia Kirova, Alain Fourquet, et al. 2013. « Long-Term Prognostic Performance of Ki67 Rate in Early Stage, pT1-pT2, pN0, Invasive Breast Carcinoma ». Édité par Ramon Andrade De Mello. *PLoS ONE* 8 (3): e55901. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055901>.
401. Richer, Jennifer K., Britta M. Jacobsen, Nicole G. Manning, M. Greg Abel, Kathryn B. Horwitz, et Douglas M. Wolf. 2002. « Differential Gene Regulation by the Two Progesterone Receptor Isoforms in Human Breast Cancer Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (7): 5209-18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110090200>.
402. Ridlon, Jason M., et H. Rex Gaskins. 2024. « Another Renaissance for Bile Acid Gastrointestinal Microbiology ». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 21 (5): 348-64. <https://doi.org/10.1038/s41575-024-00896-2>.
403. Rigamonti, E., L. Helin, S. Lestavel, A.L. Mutka, M. Lepore, C. Fontaine, M.A. Bouhrel, et al. 2005. « Liver X Receptor Activation Controls Intracellular Cholesterol Trafficking and Esterification in Human Macrophages ». *Circulation Research* 97 (7): 682-89. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000184678.43488.9f>.
404. Rimal, Bipin, Stephanie L. Collins, Ceylan E. Tanes, Edson R. Rocha, Megan A. Granda, Sumeet Solanki, Nushrat J. Hoque, et al. 2024. « Bile Salt Hydrolase Catalyses Formation of Amine-Conjugated Bile Acids ». *Nature* 626 (8000): 859-63. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06990-w>.
405. Roberts, K D, L Bandy, S Lieberman. "The occurrence and metabolism of 20 alpha-hydroxycholesterol in bovine adrenal preparations." *Biochemistry* vol. 8,3 (1969): 1259-70. <https://doi.org/10.1021/bi00831a061>
406. Róg, Tomasz, Marta Pasenkiewicz-Gierula, Ilpo Vattulainen, et Mikko Karttunen. 2009. « Ordering Effects of Cholesterol and Its Analogues ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788 (1): 97-121. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.022>.
407. Roney, Joseph C., Sunan Li, Tamar Farfel-Becker, Ning Huang, Tao Sun, Yuxiang Xie, Xiu-Tang Cheng, Mei-Yao Lin, Frances M. Platt, et Zu-Hang Sheng. 2021. « Lipid-Mediated Motor-Adaptor Sequestration Impairs Axonal Lysosome Delivery Leading to Autophagic Stress and Dystrophy in Niemann-Pick Type C ». *Developmental Cell* 56 (10): 1452-1468.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.03.032>.
408. Roscoe, Henry G., et Marvin J. Fahrenbach. 1971. « Metabolism of Cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -Triol. II. Identification of Two Major Neutral Metabolites in the Rat ». *Journal of Lipid Research* 12 (1): 17-23. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)39541-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)39541-9).
409. Roumain, Martin, Owein Guillemot-Legrís, Hafsa Amaraoui, Mireille Alhouayek, et Giulio G. Muccioli. 2023. « Identification and in Vivo Detection of Side-Chain Hydroxylated Metabolites of 4 $\beta$ -Hydroxycholesterol ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 234 (novembre):106376. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2023.106376>.
410. Roux, Charles, Claude Wolf, Nicole Mulliez, Wassila Gaoua, Valerie Cormier, Françoise Chevy, et Danièle Citadelle. 2000. « Role of Cholesterol in Embryonic Development ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 71 (5): 1270S-1279S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.5.1270s>.
411. Russell, D. 2000. « Oxysterol Biosynthetic Enzymes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1529 (1-3): 126-35. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00142-6](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00142-6).
412. Russell, David W. 2003. « The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis ». *Annual Review of Biochemistry* 72 (1): 137-74. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712>.
413. David W Russell. 2009. « Fifty Years of Advances in Bile Acid Synthesis and Metabolism ». *Journal of Lipid Research* 50 (avril):S120-25. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800026-JLR200>.
414. Russell, David W., Rebekkah W. Halford, Denise M.O. Ramirez, Rahul Shah, et Tiina Kotti. 2009. « Cholesterol 24-Hydroxylase: An Enzyme of Cholesterol Turnover in the Brain ». *Annual Review of Biochemistry* 78 (1): 1017-40. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.072407.103859>.
415. Russo, Lucia, Lindsey Muir, Lynn Geletka, Jennifer Delproposto, Nicki Baker, Carmen Flesher, Robert O'Rourke, et Carey N. Lumeng. 2020. « Cholesterol 25-Hydroxylase (CH25H) as a Promoter of Adipose Tissue Inflammation in Obesity and Diabetes ». *Molecular Metabolism* 39 (septembre):100983. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.100983>.

416. Rust, Stephan, Marie Rosier, Harald Funke, José Real, Zahir Amoura, Jean-Charles Piette, Jean-Francois Deleuze, et al. 1999. « Tangier Disease Is Caused by Mutations in the Gene Encoding ATP-Binding Cassette Transporter 1 ». *Nature Genetics* 22 (4): 352-55. <https://doi.org/10.1038/11921>.
417. Saito, Hodaka, Wakana Tachiura, Mizuki Nishimura, Makoto Shimizu, Ryuichiro Sato, et Yoshio Yamauchi. 2023. « Hydroxylation Site-Specific and Production-Dependent Effects of Endogenous Oxysterols on Cholesterol Homeostasis: Implications for SREBP-2 and LXR ». *Journal of Biological Chemistry* 299 (1): 102733. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102733>.
418. Salen, G, S Shefer, A K Batta, G S Tint, G Xu, A Honda, M Irons, et E R Elias. 1996. « Abnormal Cholesterol Biosynthesis in the Smith-Lemli-Opitz Syndrome. » *Journal of Lipid Research* 37 (6): 1169-80. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)39146-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)39146-X).
419. Salonurmi, Tuire, Heba Nabil, Justiina Ronkainen, Tuulia Hyötyläinen, Heidi Hautajärvi, Markku J. Savolainen, Ari Tolonen, et al. 2020. « 4 $\beta$ -Hydroxycholesterol Signals From the Liver to Regulate Peripheral Cholesterol Transporters ». *Frontiers in Pharmacology* 11 (mars):361. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00361>.
420. Sanche, Leon, et Johan E. Van Lier. 1976. « Tracer Studies of Cholesterol Degradation Induced by Ionized Gases ». *Chemistry and Physics of Lipids* 16 (4): 225-38. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(76\)90018-9](https://doi.org/10.1016/0009-3084(76)90018-9).
421. Sanchez, Lorena Diaz, Lorenzo Pontini, Maura Marinozzi, Lissette Carolina Sanchez-Aranguren, Ana Reis, et Irundika H.K. Dias. 2021. « Cholesterol and Oxysterol Sulfates: Pathophysiological Roles and Analytical Challenges ». *British Journal of Pharmacology* 178 (16): 3327-41. <https://doi.org/10.1111/bph.15227>.
422. Sánchez-Guijo, Alberto, Vinzenz Oji, Michaela F. Hartmann, Hans-Christian Schuppe, Heiko Traupe, et Stefan A. Wudy. 2015. « High Levels of Oxysterol Sulfates in Serum of Patients with Steroid Sulfatase Deficiency ». *Journal of Lipid Research* 56 (2): 403-12. <https://doi.org/10.1194/jlr.M055608>.
423. Sato, R., Y. Atsuta, Y. Imai, S. Taniguchi, et K. Okuda. 1977. « Hepatic Mitochondrial Cytochrome P -450: Isolation and Functional Characterization ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12): 5477-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5477>.
424. Schaaf, Christian P., Janet Koster, Panagiotis Katsonis, Lisa Kratz, Oleg A. Shchelochkov, Fernando Scaglia, Richard I. Kelley, Olivier Lichtarge, Hans R. Waterham, et Marwan Shinawi. 2011. « Desmosterolosis—Phenotypic and Molecular Characterization of a Third Case and Review of the Literature ». *American Journal of Medical Genetics Part A* 155 (7): 1597-1604. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34040>.
425. Schaich, Karen M., Fereidoon Shahidi, Ying Zhong, et N. A. Michael Eskin. 2013. « Lipid Oxidation ». In *Biochemistry of Foods*, 419-78. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091809-9.00011-X>.
426. Schnitt, Stuart J. 2010. « Classification and Prognosis of Invasive Breast Cancer: From Morphology to Molecular Taxonomy ». *Modern Pathology* 23 (mai):S60-64. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.33>.
427. Schoenheimer, Rudolf, et Fritz Breusch. 1933. « SYNTHESIS AND DESTRUCTION OF CHOLESTEROL IN THE ORGANISM ». *Journal of Biological Chemistry* 103 (2): 439-48. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)75823-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)75823-7).
428. Schöls, Ludger, Tim W Rattay, Peter Martus, Christoph Meisner, Jonathan Baets, Imma Fischer, Christine Jäggle, et al. 2017. « Hereditary Spastic Paraplegia Type 5: Natural History, Biomarkers and a Randomized Controlled Trial ». *Brain* 140 (12): 3112-27. <https://doi.org/10.1093/brain/awx273>.
429. Schroepfer, George J. 2000. « Oxysterols: Modulators of Cholesterol Metabolism and Other Processes ». *Physiological Reviews* 80 (1): 361-554. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.361>.
430. Schüle, Rebecca, Teepu Siddique, Han-Xiang Deng, Yi Yang, Sandra Donkervoort, Magnus Hansson, Ricardo E. Madrid, Nailah Siddique, Ludger Schöls, et Ingemar Björkhem. 2010. « Marked Accumulation of 27-Hydroxycholesterol in SPG5 Patients with Hereditary Spastic Paresis ». *Journal of Lipid Research* 51 (4): 819-23. <https://doi.org/10.1194/jlr.M002543>.
431. Schuler, G. 2021. « Steroid Sulfates in Domestic Mammals and Laboratory Rodents ». *Domestic Animal Endocrinology* 76 (juillet):106622. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2021.106622>.
432. Schultz, Joshua R., Hua Tu, Alvin Luk, Joyce J. Repa, Julio C. Medina, Leping Li, Susan Schwendner, et al. 2000. « Role of LXRs in Control of Lipogenesis ». *Genes & Development* 14 (22): 2831-38. <https://doi.org/10.1101/gad.850400>.

- 433.Schwarz, Margrit, Erik G. Lund, Richard Lathe, Ingemar Björkhem, et David W. Russell. 1997. « Identification and Characterization of a Mouse Oxysterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase cDNA ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (38): 23995-1. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.23995>.
- 434.Schwarz, Margrit, Angelique C. Wright, Daphne L. Davis, Hisham Nazer, Ingemar Björkhem, et David W. Russell. 2000. « The Bile Acid Synthetic Gene 3 $\beta$ -Hydroxy- $\Delta$ 5-C27-Steroid Oxidoreductase Is Mutated in Progressive Intrahepatic Cholestasis ». *Journal of Clinical Investigation* 106 (9): 1175-84. <https://doi.org/10.1172/JCI10902>.
- 435.Schweizer, Roberto A.S., Marcel Zürcher, Zoltan Balazs, Bernhard Dick, et Alex Odermatt. 2004. « Rapid Hepatic Metabolism of 7-Ketocholesterol by 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (18): 18415-24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313615200>.
- 436.Schwenk, Erwin, Nicholas T. Werthessen, et Harris Rosenkrantz. 1952. « Studies on the Biosynthesis of Cholesterol. II. Isolation of 3 Beta, 5 Alpha-Dihydroxy-6-Ketocholestane from Cholesterol ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 37 (2): 247-51. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(52\)90187-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(52)90187-2).
- 437.Segala, Gregory, Marion David, Philippe De Medina, Mathias C. Poirot, Nizar Serhan, François Vergez, Aurelie Mougel, et al. 2017a. « Dendrogenin A Drives LXR to Trigger Lethal Autophagy in Cancers ». *Nature Communications* 8 (1): 1903. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01948-9>.
- 438.Segala, Gregory, Philippe De Medina, Luigi Iuliano, Chiara Zerbinati, Michael R. Paillasse, Emmanuel Noguer, Florence Dalenc, et al. 2013. « 5,6-Epoxy-Cholesterols Contribute to the Anticancer Pharmacology of Tamoxifen in Breast Cancer Cells ». *Biochemical Pharmacology* 86 (1): 175-89. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.031>.
- 439.Seidegard, Janeric, et Gunilla Ekstr. 1997. « The Role of Human Glutathione Transferases and Epoxide Hydrolases in the Metabolism of Xenobiotics ». *Environmental Health Perspectives* 105.
- 440.Selcer, Kyle W., Heidi M. DiFrancesca, Abhinav B. Chandra, et Pui-Kai Li. 2007. « Immunohistochemical Analysis of Steroid Sulfatase in Human Tissues ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 105 (1-5): 115-23. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.12.105>.
- 441.Serhan, Nizar, Pierre-Luc Mouchel, Philippe De Medina, Gregory Segala, Aurélie Mougel, Estelle Saland, Arnaud Rives, et al. 2020. « Dendrogenin A Synergizes with Cytarabine to Kill Acute Myeloid Leukemia Cells In Vitro and In Vivo ». *Cancers* 12 (7): 1725. <https://doi.org/10.3390/cancers12071725>.
- 442.Setoguchi, T., Gerald Salen, G. S. Tint, et E. H. Mosbach. 1974. « A Biochemical Abnormality in Cerebrotendinous Xanthomatosis IMPAIRMENT OF BILE ACID BIOSYNTHESIS ASSOCIATED WITH INCOMPLETE DEGRADATION OF THE CHOLESTEROL SIDE CHAIN ». *Journal of Clinical Investigation* 53 (5): 1393-1401. <https://doi.org/10.1172/JCI107688>.
- 443.Sevanian, A, et L L McLeod. 1986. « Catalytic Properties and Inhibition of Hepatic Cholesterol-Epoxy Hydrolase. » *Journal of Biological Chemistry* 261 (1): 54-59. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)42429-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)42429-X).
- 444.Sevanian, A, et A R Peterson. 1984. « Cholesterol Epoxide Is a Direct-Acting Mutagen. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81 (13): 4198-4202. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.13.4198>.
- 445.Sevanian, A., et A.R. Peterson. 1986. « The Cytotoxic and Mutagenic Properties of Cholesterol Oxidation Products ». *Food and Chemical Toxicology* 24 (10-11): 1103-10. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(86\)90295-4](https://doi.org/10.1016/0278-6915(86)90295-4).
- 446.Shanklin, John, et Edgar B. Cahoon. 1998. « DESATURATION AND RELATED MODIFICATIONS OF FATTY ACIDS ». *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49 (1): 611-41. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.611>.
- 447.Sharpe, Laura J., et Andrew J. Brown. 2013. « Controlling Cholesterol Synthesis beyond 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase (HMGCR) ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (26): 18707-15. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.479808>.
- 448.Sharpe, Laura J., Hudson W. Coates, et Andrew J. Brown. 2020. « Post-Translational Control of the Long and Winding Road to Cholesterol ». *Journal of Biological Chemistry* 295 (51): 17549-59. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.010723>.

449. Shih, Meng-Chun Monica, Yi-Ning Chiu, Meng-Chun Hu, Ing-Chern Guo, et Bon-chu Chung. 2011. « Regulation of Steroid Production: Analysis of Cyp11a1 Promoter ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 336 (1-2): 80-84. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.12.017>.
450. Shinar, Doron M., Naoto Endo, Su Jane Rutledge, Rob Vogel, Gideon A. Rodan, et Azriel Schmidt. 1994. « NER, a New Member of the Gene Family Encoding the Human Steroid Hormone Nuclear Receptor ». *Gene* 147 (2): 273-76. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90080-9).
451. Shinkyo, Raku, Libin Xu, Keri A. Tallman, Qian Cheng, Ned A. Porter, et F. Peter Guengerich. 2011. « Conversion of 7-Dehydrocholesterol to 7-Ketocholesterol Is Catalyzed by Human Cytochrome P450 7A1 and Occurs by Direct Oxidation without an Epoxide Intermediate ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (38): 33021-28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.282434>.
452. Shiota, Masakazu, et Mark A. Magnuson. 2008. « Hepatic Glucose Sensing: Does Flux Matter? » *Journal of Clinical Investigation* 118 (3): 841-44. <https://doi.org/10.1172/JCI35137>.
453. Sikora, Darryn M, Mark Ruggiero, Kersti Petit-Kekel, Louise S Merkens, William E Connor, et Robert D Steiner. 2004. « Cholesterol Supplementation Does Not Improve Developmental Progress in Smith-Lemli-Opitz Syndrome ». *The Journal of Pediatrics* 144 (6): 783-91. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2004.02.036>.
454. Silva, Suelen Feitoza, Débora Levy, Jorge Luis Maria Ruiz, Thatiana Correa De Melo, Cesar Isaac, Máira Luísa Fidelis, Alessandro Rodrigues, et Sérgio Paulo Bydlowski. 2017. « Oxysterols in Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Death ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 169 (mai):164-75. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.04.017>.
455. Silvente-Poirot, Sandrine, Florence Dalenc, et Marc Poirot. 2018. « The Effects of Cholesterol-Derived Oncometabolites on Nuclear Receptor Function in Cancer ». *Cancer Research* 78 (17): 4803-8. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1487>.
456. Silvente-Poirot, Sandrine, Philippe De Medina, Michel Record, et Marc Poirot. 2016. « From Tamoxifen to Dendrogenin A: The Discovery of a Mammalian Tumor Suppressor and Cholesterol Metabolite ». *Biochimie* 130 (novembre):109-14. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.05.016>.
457. Silvente-Poirot, Sandrine, et Marc Poirot. 2012a. « Cholesterol Epoxide Hydrolase and Cancer ». *Current Opinion in Pharmacology* 12 (6): 696-703. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.07.007>.
458. Silvente-Poirot, Sandrine, Gregory Segala, Mathias C. Poirot, et Marc Poirot. 2018. « Ligand-Dependent Transcriptional Induction of Lethal Autophagy: A New Perspective for Cancer Treatment ». *Autophagy* 14 (3): 555-57. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1425059>.
459. Simic, Michael G., et Marcus Karel, éd. 1980. *Autoxidation in Food and Biological Systems*. Boston, MA: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9351-2>.
460. Simons, Kai, et Elina Ikonen. 1997. « Functional Rafts in Cell Membranes ». *Nature* 387 (6633): 569-72. <https://doi.org/10.1038/42408>.
461. Simons, Kai, et Winchil L.C. Vaz. 2004. « Model Systems, Lipid Rafts, and Cell Membranes ». *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 33 (1): 269-95. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.141803>.
462. Slamon, Dennis J, Gary M Clark, et Steven G Wong. 1987. « Human Breast Cancer: Correlation of Relapse and Survival with Amplification » 235. *Science (New York, N.Y.)* vol. 235,4785 (1987): 177-82. <https://doi.org/10.1126/science.3798106>
463. Sleat, David E., Jennifer A. Wiseman, Mukarram El-Banna, Sandy M. Price, Lucie Verot, Michael M. Shen, G. Stephen Tint, Marie T. Vanier, Steven U. Walkley, et Peter Lobel. 2004. « Genetic Evidence for Nonredundant Functional Cooperativity between NPC1 and NPC2 in Lipid Transport ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (16): 5886-91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308456101>.
464. Smith, Carolyn L., et Bert W. O'Malley. 2004. « Coregulator Function: A Key to Understanding Tissue Specificity of Selective Receptor Modulators ». *Endocrine Reviews* 25 (1): 45-71. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0023>.
465. Smith, Leland L. 1987. « Cholesterol Autoxidation 1981–1986 ». *Chemistry and Physics of Lipids* 44 (2-4): 87-125. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(87\)90046-6](https://doi.org/10.1016/0009-3084(87)90046-6).



466. Leland Smith. 1996. « Review of Progress in Sterol Oxidations: 1987–1995 ». *Lipids* 31 (5): 453-87. <https://doi.org/10.1007/BF02522641>.
467. Smith, Leland L., et Martin J. Kulig. 1976. « Sterol metabolism. XXXIX. Singlet molecular oxygen from hydrogen peroxide disproportionation ». *Journal of the American Chemical Society* 98 (4): 1027-29. <https://doi.org/10.1021/ja00420a034>.
468. Smith, Leland L., Martin J. Kulig, Denis Müller, et A. S. Ansari. 1976. « Oxidation of Cholesterol by Dioxygen Species ». *Journal of the American Chemical Society* Vol 100/Issue 19.
469. Smith, Leland L., Martin J. Kulig, et Jon I. Teng. 1977. « Sterol Metabolism. XL. On the Failure of Superoxide Radical Anion to React with Cholesterol ». *Chemistry and Physics of Lipids* 20 (3): 211-15. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(77\)90036-6](https://doi.org/10.1016/0009-3084(77)90036-6).
470. Smith, Leland L., W. Stephen Matthews, John C. Price, Richard C. Bachmann, et Brian Reynolds. 1967. « Thin-Layer Chromatographic Examination of Cholesterol Autoxidation ». *Journal of Chromatography A* 27 (janvier): 187-205. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)85851-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)85851-9).
471. Smith, Leland L., et Johan E. Van Lier. 1971. « Sterol Metabolism. XIV. Cholesterol 24-Hydroperoxide ». *The Journal of Organic Chemistry* 36 (7): 1007-9. <https://doi.org/10.1021/jo00806a038>.
472. Smondyrev, Alexander M., et Max L. Berkowitz. 1999. « Structure of Dipalmitoylphosphatidylcholine/Cholesterol Bilayer at Low and High Cholesterol Concentrations: Molecular Dynamics Simulation ». *Biophysical Journal* 77 (4): 2075-89. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77049-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77049-9).
473. Song, C., R. A. Hiipakka, et S. Liao. 2000. « Selective Activation of Liver X Receptor Alpha by 6alpha-Hydroxy Bile Acids and Analogs ». *Steroids* 65 (8): 423-27. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(00\)00127-6](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(00)00127-6).
474. Song, Ching, Richard A. Hiipakka, et Shutsung Liao. 2001. « Auto-Oxidized Cholesterol Sulfates Are Antagonistic Ligands of Liver X Receptors: Implications for the Development and Treatment of Atherosclerosis ». *Steroids* 66 (6): 473-79. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(00\)00239-7](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(00)00239-7).
475. Sørli, Therese, Charles M. Perou, Robert Tibshirani, Turid Aas, Stephanie Geisler, Hilde Johnsen, Trevor Hastie, et al. 2001. « Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses with Clinical Implications ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (19): 10869-74.
476. Sottero, Barbara, Daniela Rossin, Erica Staurengi, Paola Gamba, Giuseppe Poli, et Gabriella Testa. 2019a. « Omics Analysis of Oxysterols to Better Understand Their Pathophysiological Role ». *Free Radical Biology and Medicine* 144 (novembre): 55-71. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.026>.
477. Souidi, Maamar, Sandrine Dubrac, Michel Parquet, David H. Volle, Jean-Marc A. Lobaccaro, Denis Mathé, Olivier Combes, Pascale Scanff, Claude Lutton, et Jocelyne Aigueperse. 2004. « Les oxystérols : métabolisme, rôles biologiques et pathologies associées ». *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 28 (3): 279-93. [https://doi.org/10.1016/S0399-8320\(04\)94919-6](https://doi.org/10.1016/S0399-8320(04)94919-6).
478. Soulès, Régis, Fabien Audouard-Combe, Emilie Huc-Claustre, Philippe De Medina, Arnaud Rives, Etienne Chatelut, Florence Dalenc, et al. 2019. « A Fast UPLC–HILIC Method for an Accurate Quantification of Dendrogenin A in Human Tissues ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 194 (novembre): 105447. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105447>.
479. Spencer, T. A., A. K. Gayen, S. Phirwa, J. A. Nelson, F. R. Taylor, A. A. Kandutsch, et S. K. Erickson. 1985. « 24(S),25-Epoxycholesterol. Evidence Consistent with a Role in the Regulation of Hepatic Cholesterogenesis. » *Journal of Biological Chemistry* 260 (25): 13391-94. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38732-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38732-X).
480. Spencer, Thomas A. 1994. « The Squalene Dioxide Pathway of Steroid Biosynthesis ». *Accounts of Chemical Research* 27 (3): 83-90. <https://doi.org/10.1021/ar00039a004>.
481. Spiteller, G. 2006. « Peroxyl Radicals: Inductors of Neurodegenerative and Other Inflammatory Diseases. Their Origin and How They Transform Cholesterol, Phospholipids, Plasmalogens, Polyunsaturated Fatty Acids, Sugars, and Proteins into Deleterious Products ». *Free Radical Biology and Medicine* 41 (3): 362-87. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.03.013>.



482. Stanway, Susannah J., Patrick Delavault, Atul Purohit, L. W. Lawrence Woo, Christophe Thurieau, Barry V. L. Potter, et Michael J. Reed. 2007. « Steroid Sulfatase: A New Target for the Endocrine Therapy of Breast Cancer ». *The Oncologist* 12 (4): 370-74. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-4-370>.
483. Stellaard, Frans, Klaus Von Bergmann, Thomas Sudhop, et Dieter Lütjohann. 2017. « The Value of Surrogate Markers to Monitor Cholesterol Absorption, Synthesis and Bioconversion to Bile Acids under Lipid Lowering Therapies ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 169 (mai):111-22. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.030>.
484. Stern, Sydney, Karryn Crisamore, Robert Schuck, et Michael Pacanowski. 2024. « Evaluation of the Landscape of Pharmacodynamic Biomarkers in Niemann-Pick Disease Type C (NPC) ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 19 (1): 280. <https://doi.org/10.1186/s13023-024-03233-7>.
485. Strott, Charles A., et Yuko Higashi. 2003. « Cholesterol Sulfate in Human Physiology: What's It All About? » *Journal of Lipid Research* 44 (7): 1268-78. <https://doi.org/10.1194/jlr.R300005-JLR200>.
486. Strushkevich, Natallia, Farrell MacKenzie, Tatyana Cherkasova, Irina Grabovec, Sergey Usanov, et Hee-Won Park. 2011. « Structural Basis for Pregnenolone Biosynthesis by the Mitochondrial Monooxygenase System ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (25): 10139-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019441108>.
487. Sutherland, Robert L., Leigh C. Murphy, Ming San Foo, Michael D. Green, Anne M. Whybourne, et Zygmunt S. Krozowski. 1980. « High-Affinity Anti-Oestrogen Binding Site Distinct from the Oestrogen Receptor ». *Nature* 288 (5788): 273-75. <https://doi.org/10.1038/288273a0>.
488. Swain, Sandra M., Mythili Shastry, et Erika Hamilton. 2023. « Targeting HER2-Positive Breast Cancer: Advances and Future Directions ». *Nature Reviews Drug Discovery* 22 (2): 101-26. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00579-0>.
489. Taank, Yogain, Vinay Randhawa, et Navneet Agnihotri. 2024. « Ergosterol and Its Metabolites as Agonists of Liver X Receptor and Their Anticancer Potential in Colorectal Cancer ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, juin, 106572. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2024.106572>.
490. Tadashi, Watabe, Tsubaki Atsushi, Isobe Masakazu, Ozawa Naoki, et Hiratsuka Akira. 1984. « A Mechanism for Epoxidation of Cholesterol by Hepatic Microsomal Lipid Hydroperoxides ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 795 (1): 60-66. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(84\)90104-8](https://doi.org/10.1016/0005-2760(84)90104-8).
491. Takeuchi, Cindy, Roger Galvé, Jorgé Nieva, Daniel P. Witter, Anita D. Wentworth, Ryan P. Troseth, Richard A. Lerner, et Paul Wentworth. 2006. « Proatherogenic Effects of the Cholesterol Ozonolysis Products, Atheronal-A and Atheronal-B ». *Biochemistry* 45 (23): 7162-70. <https://doi.org/10.1021/bi0604330>.
492. Tars, Kaspars, Birgit Olin, et Bengt Mannervik. 2010. « Structural Basis for Featuring of Steroid Isomerase Activity in Alpha Class Glutathione Transferases ». *Journal of Molecular Biology* 397 (1): 332-40. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.01.023>.
493. Tavazoie, Masoud F., Ilana Pollack, Raissa Tanqueco, Benjamin N. Ostendorf, Bernardo S. Reis, Foster C. Gonsalves, Isabel Kurth, et al. 2018. « LXR/ApoE Activation Restricts Innate Immune Suppression in Cancer ». *Cell* 172 (4): 825-840.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.026>.
494. Taylor, F R, S E Saucier, E P Shown, E J Parish, et A A Kandutsch. 1984. « Correlation between Oxysterol Binding to a Cytosolic Binding Protein and Potency in the Repression of Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A Reductase. » *Journal of Biological Chemistry* 259 (20): 12382-87. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)90757-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)90757-X).
495. Teboul, M, E Enmark, Q Li, A C Wikström, M Peltö-Huikko, et J A Gustafsson. 1995. « OR-1, a Member of the Nuclear Receptor Superfamily That Interacts with the 9-Cis-Retinoic Acid Receptor. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (6): 2096-2100. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.6.2096>.
496. Tempel, Wolfram, Irina Grabovec, Farrell MacKenzie, Yaroslav V. Dichenko, Sergey A. Usanov, Andrei A. Gilep, Hee-Won Park, et Natallia Strushkevich. 2014. « Structural Characterization of Human Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase ». *Journal of Lipid Research* 55 (9): 1925-32. <https://doi.org/10.1194/jlr.M050765>.
497. Terao, Junji. 2014. « Cholesterol Hydroperoxides and Their Degradation Mechanism ». In *Lipid Hydroperoxide-Derived Modification of Biomolecules*, édité par Yoji Kato, 77:83-91. Subcellular Biochemistry. Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-7920-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7920-4_7).

498. Teslenko, Irina, Christy J.W. Watson, Zuping Xia, Gang Chen, et Philip Lazarus. 2021. « Characterization of Cytosolic Glutathione S-Transferases Involved in the Metabolism of the Aromatase Inhibitor, Exemestane ». *Drug Metabolism and Disposition* 49 (12): 1047-55. <https://doi.org/10.1124/dmd.121.000635>.
499. Tew, K. D., A. Monks, L. Barone, D. Rosser, G. Akerman, J. A. Montali, J. B. Wheatley, et D. E. Schmidt. 1996. « Glutathione-Associated Enzymes in the Human Cell Lines of the National Cancer Institute Drug Screening Program ». *Molecular Pharmacology* 50 (1): 149-59.
500. Theofilopoulos, Spyridon, Willy Antoni Abreu De Oliveira, Shanzheng Yang, Eylan Yutuc, Ahmed Saeed, Jonas Abdel-Khalik, Abbe Ullgren, et al. 2019. « 24(S),25-Epoxycholesterol and Cholesterol 24S-Hydroxylase (CYP46A1) Overexpression Promote Midbrain Dopaminergic Neurogenesis in Vivo ». *Journal of Biological Chemistry* 294 (11): 4169-76. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005639>.
501. Tint, G. S., P. Pentchev, G. Xu, A. K. Batta, S. Shefer, G. Salen, et A. Honda. 1998. « Cholesterol and Oxygenated Cholesterol Concentrations Are Markedly Elevated in Peripheral Tissue but Not in Brain from Mice with the Niemann–Pick Type C Phenotype ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 21 (8): 853-63. <https://doi.org/10.1023/A:1005474803278>.
502. Toll, Anders, Kjell Wikvall, Elly Sudjana-Sugiaman, Kazu-Hiro Kondo, et Ingemar Björkhem. 1994. « 7 $\alpha$  Hydroxylation of 25-Hydroxycholesterol in Liver Microsomes: Evidence That the Enzyme Involved Is Different from Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase ». *European Journal of Biochemistry* 224 (2): 309-16. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.00309.x>.
503. Tolomeu, Heber Victor, et Carlos Alberto Manssour Fraga. 2023. « Imidazole: Synthesis, Functionalization and Physicochemical Properties of a Privileged Structure in Medicinal Chemistry ». *Molecules* 28 (2): 838. <https://doi.org/10.3390/molecules28020838>.
504. Tomono, Susumu, Noriyuki Miyoshi, Kazuaki Sato, Yoshihiro Ohba, et Hiroshi Ohshima. 2009. « Formation of Cholesterol Ozonolysis Products through an Ozone-Free Mechanism Mediated by the Myeloperoxidase–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>–Chloride System ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 383 (2): 222-27. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.155>.
505. Tong, Christy W. S., Mingxia Wu, William C. S. Cho, et Kenneth K. W. To. 2018. « Recent Advances in the Treatment of Breast Cancer ». *Frontiers in Oncology* 8 (juin):227. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00227>.
506. Trent, Simon. 2013. « Cognitive, Behavioural and Psychiatric Phenotypes Associated with Steroid Sulfatase Deficiency ». *World Journal of Translational Medicine* 2 (1): 1. <https://doi.org/10.5528/wjtm.v2.i1.1>.
507. Tsaousidou, Maria K., Karim Ouahchi, Tom T. Warner, Yi Yang, Michael A. Simpson, Nigel G. Laing, Philip A. Wilkinson, et al. 2008. « Sequence Alterations within CYP7B1 Implicate Defective Cholesterol Homeostasis in Motor-Neuron Degeneration ». *The American Journal of Human Genetics* 82 (2): 510-15. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.10.001>.
508. Tsaousidou, Maria K., Karim Ouahchi, Tom T. Warner, Yi Yang, Michael A. Simpson, Nigel G. Laing, Philip A. Wilkinson, et al. 2008. « Sequence Alterations within CYP7B1 Implicate Defective Cholesterol Homeostasis in Motor-Neuron Degeneration ». *The American Journal of Human Genetics* 82 (2): 510-15. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.10.001>.
509. Tsikas D. Rat liver glutathione S-transferase-catalyzed conjugation of glutathione to the endogenous epoxides of oleic acid and cholesterol. *Anal Biochem.* 2022 May 1;644:113994. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113994>.
510. Umetani, Michihisa, Hideharu Domoto, Andrew K Gormley, Ivan S Yuhanna, Carolyn L Cummins, Norman B Javitt, Kenneth S Korach, Philip W Shaul, et David J Mangelsdorf. 2007. « 27-Hydroxycholesterol Is an Endogenous SERM That Inhibits the Cardiovascular Effects of Estrogen ». *Nature Medicine* 13 (10): 1185-92. <https://doi.org/10.1038/nm1641>.
511. Utsumi, Toshiaki, Noriko Yoshimura, Shinji Takeuchi, Morito Maruta, Kotaro Maeda, et Nobuhiro Harada. 2000. « Elevated Steroid Sulfatase Expression in Breast Cancers ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 73 (3-4): 141-45. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(00\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(00)00060-1).
512. Uxa, Sigrid, Paola Castillo-Binder, Robin Kohler, Konstanze Stangner, Gerd A. Müller, et Kurt Engeland. 2021. « Ki-67 Gene Expression ». *Cell Death & Differentiation* 28 (12): 3357-70. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00823-x>.

513. Van Lier, J.E., et J. Rousseau. 1976. « Mechanism of Cholesterol Side-chain Cleavage: Enzymic Rearrangement of 20 $\beta$ -hydroperoxy-20-isocholesterol to 20 $\beta$ ,21-dihydroxy-20-isocholesterol ». *FEBS Letters* 70 (1-2): 23-27. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(76\)80718-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80718-1).
514. Van Lier, Johan E., et Gordon Kan. 1972. « Cholesterol 26-Hydroperoxide ». *The Journal of Organic Chemistry* 37 (1): 145-47. <https://doi.org/10.1021/jo00966a043>.
515. Van Lier, Johan E., et Leland Leroy Smith. 1970. « Sterol Metabolism. VII. Autoxidation of Cholesterol via Hydroperoxide Intermediates ». *The Journal of Organic Chemistry* 35 (8): 2627-32. <https://doi.org/10.1021/jo00833a031>.
516. Van Loon, Nienke M., Dan Lindholm, et Noam Zelcer. 2019. « The E3 Ubiquitin Ligase Inducible Degradable of the LDL Receptor/Myosin Light Chain Interacting Protein in Health and Disease ». *Current Opinion in Lipidology* 30 (3): 192-97. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000593>.
517. Vance, Jean E, et Kyle B Peake. 2011. « Function of the Niemann–Pick Type C Proteins and Their Bypass by Cyclodextrin ». *Current Opinion in Lipidology* 22 (3): 204-9. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283453e69>.
518. Vanlier, J, et L Smith. 1970. « Sterol Metabolism. XI. Thermal Decomposition of Some Cholesterol Hydroperoxides ». *Steroids* 15 (4): 485-503. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(70\)80078-2](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(70)80078-2).
519. Vaska, Lauri. 1976. « Dioxygen-Metal Complexes: Toward a Unified View ». *Accounts of Chemical Research* 9 (5): 175-83. <https://doi.org/10.1021/ar50101a002>.
520. Venkateswaran, Asha, Bryan A. Laffitte, Sean B. Joseph, Puiying A. Mak, Damien C. Wilpitz, Peter A. Edwards, et Peter Tontonoz. 2000. « Control of Cellular Cholesterol Efflux by the Nuclear Oxysterol Receptor LXR $\alpha$  ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (22): 12097-102. <https://doi.org/10.1073/pnas.200367697>.
521. Vianello, Robert, et Janez Mavri. 2012. « Microsolvation of the Histamine Monocation in Aqueous Solution: The Effect on Structure, Hydrogen Bonding Ability and Vibrational Spectrum ». *New Journal of Chemistry* 36 (4): 954. <https://doi.org/10.1039/c2nj20877f>.
522. Viennois, Emilie, Kevin Mouzat, Julie Dufour, Laurent Morel, Jean-Marc Lobaccaro, et Silvére Baron. 2012. « Selective Liver X Receptor Modulators (SLiMs): What Use in Human Health? » *Molecular and Cellular Endocrinology* 351 (2): 129-41. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.08.036>.
523. Vila, Andrew, Witold Korytowski, et Albert W. Girotti. 2001. « Spontaneous Intermembrane Transfer of Various Cholesterol-Derived Hydroperoxide Species: Kinetic Studies with Model Membranes and Cells ». *Biochemistry* 40 (48): 14715-26. <https://doi.org/10.1021/bi011408r>.
524. Vlahcevic, Z. Reno, W. Michael Pandak, et R. Todd Stravitz. 1999. « REGULATION OF BILE ACID BIOSYNTHESIS ». *Gastroenterology Clinics of North America* 28 (1): 1-25. [https://doi.org/10.1016/S0889-8553\(05\)70041-8](https://doi.org/10.1016/S0889-8553(05)70041-8).
525. Vodicka, Pavel, Mikko Koskinen, Michael Arand, Franz Oesch, et Kari Hemminki. 2002. « Spectrum of Styrene-Induced DNA Adducts: The Relationship to Other Biomarkers and Prospects in Human Biomonitoring ». *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 511 (3): 239-54. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(02\)00012-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(02)00012-1).
526. Voisin, Maud, Philippe De Medina, Arnaud Mallinger, Florence Dalenc, Emilie Huc-Claustre, Julie Leignadier, Nizar Serhan, et al. 2017. « Identification of a Tumor-Promoter Cholesterol Metabolite in Human Breast Cancers Acting through the Glucocorticoid Receptor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (44). <https://doi.org/10.1073/pnas.1707965114>.
527. Voisin, Maud, Sandrine Silvente-Poirot, et Marc Poirot. 2014. « One Step Synthesis of 6-Oxo-Cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -Diol ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446 (3): 782-85. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.138>.
528. Wade, D.R., S.C. Airy, et J.E. Sinsheimer. 1978. « Mutagenicity of Aliphatic Epoxides ». *Mutation Research/Genetic Toxicology* 58 (2-3): 217-23. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(78\)90012-5](https://doi.org/10.1016/0165-1218(78)90012-5).
529. Wagner, Brandee L., Annabel F. Valledor, Gang Shao, Chris L. Daige, Eric D. Bischoff, Mary Petrowski, Kristen Jepsen, et al. 2003. « Promoter-Specific Roles for Liver X Receptor/Corepressor Complexes in the Regulation

- of ABCA1 and SREBP1 Gene Expression ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (16): 5780-89. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.16.5780-5789.2003>.
530. Walsh, A. D. 1949. « The Structures of Ethylene Oxide, Cyclopropane, and Related Molecules ». *Transactions of the Faraday Society* 45:179. <https://doi.org/10.1039/tf9494500179>.
531. Wang, Bo, et Peter Tontonoz. 2018. « Liver X Receptors in Lipid Signalling and Membrane Homeostasis ». *Nature Reviews Endocrinology* 14 (8): 452-63. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0037-x>.
532. Wang, Jun, et San-Gang Wu. 2023. « Breast Cancer: An Overview of Current Therapeutic Strategies, Challenge, and Perspectives ». *Breast Cancer: Targets and Therapy* Volume 15 (octobre):721-30. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S432526>.
533. Wang, Yaqiong, Jin Zhang, Jie Chen, Dan Wang, Yang Yu, Pei Qiu, Qiqi Wang, Wenbao Zhao, Zhao Li, et Ting Lei. 2022. « Ch25h and 25-HC Prevent Liver Steatosis through Regulation of Cholesterol Metabolism and Inflammation ». *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 54 (4): 504-13. <https://doi.org/10.3724/abbs.2022030>.
534. Wang, Yongjun, Pamela M. Rogers, Keith R. Stayrook, Chen Su, Gabor Varga, Qi Shen, Sunil Nagpal, et Thomas P. Burris. 2008. « The Selective Alzheimer's Disease Indicator-1 Gene ( *Seladin-1/DHCR24* ) Is a Liver X Receptor Target Gene ». *Molecular Pharmacology* 74 (6): 1716-21. <https://doi.org/10.1124/mol.108.048538>.
535. Wang, Yongjun, Pamela M. Rogers, Chen Su, Gabor Varga, Keith R. Stayrook, et Thomas P. Burris. 2008. « Regulation of Cholesterologenesis by the Oxysterol Receptor, LXR $\alpha$  ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (39): 26332-39. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804808200>.
536. Wang, Yuqin, Kyle M. Sousa, Karl Bodin, Spyridon Theofilopoulos, Paola Sacchetti, Martin Hornshaw, Gary Woffendin, et al. 2009. « Targeted Lipidomic Analysis of Oxysterols in the Embryonic Central Nervous System ». *Molecular BioSystems* 5 (5): 529. <https://doi.org/10.1039/b819502a>.
537. Warren, James C., et Alfred P. French. 1965. « Distribution of Steroid Sulfatase in Human Tissues ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 25 (2): 278-82. <https://doi.org/10.1210/jcem-25-2-278>.
538. Watabe, T., M. Kanai, M. Isobe, et N. Ozawa. 1981. « The Hepatic Microsomal Biotransformation of Delta 5-Steroids to 5 Alpha, 6 Beta-Glycols via Alpha- and Beta-Epoxides. » *Journal of Biological Chemistry* 256 (6): 2900-2907. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)69699-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)69699-7).
539. Watabe, T, et T Sawahata. 1979. « Biotransformation of Cholesterol to Cholestane-3beta,5alpha,6beta-Triol via Cholesterol Alpha-Epoxide (5alpha,6alpha-Epoxycholestan-3beta-Ol) in Bovine Adrenal Cortex. » *Journal of Biological Chemistry* 254 (10): 3854-60. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)50665-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)50665-7).
540. Watabe, Tadashi, Masakazu Isobe, et Atsushi Tsubaki. 1982. « Epoxidation of Cholesterol by Hepatic Microsomal Lipid Hydroperoxides ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 108 (2): 724-30. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(82\)90889-0](https://doi.org/10.1016/0006-291X(82)90889-0).
541. Watabe, Tadashi, Mieko Kanai, Masakazu Isobe, et Naoki Ozawa. 1980. « Cholesterol  $\alpha$ - and  $\beta$ -Epoxides as Obligatory Intermediates in the Hepatic Microsomal Metabolism of Cholesterol to Cholestanetriol ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 619 (2): 414-19. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(80\)90090-9](https://doi.org/10.1016/0005-2760(80)90090-9).
542. Watabe, Tadashi, et Tadashi Sawahata. 1978. « The Recently Proposed 20,22-Epoxycholesterol as the Intermediate in the Conversion of Cholesterol to Pregnenolone by Adrenal Cortex Mitochondria Must Be 5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -Epoxycholestan-3 $\beta$ -Ol ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 83 (4): 1396-1403. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(78\)91376-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(78)91376-1).
543. Watabe, Tadashi, Tadashi Sawahata, et Junko Horie. 1979. « Evidence for the Formation of a Steroid S-Glutathione Conjugate from an Epoxysteroid Precursor ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 87 (2): 469-75. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(79\)91819-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(79)91819-9).
544. Waterham, Hans R. 2006. « Defects of Cholesterol Biosynthesis ». *FEBS Letters* 580 (23): 5442-49. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.027>.
545. Watts, C K, L C Murphy, et R L Sutherland. 1984. « Microsomal Binding Sites for Nonsteroidal Anti-Estrogens in MCF 7 Human Mammary Carcinoma Cells. Demonstration of High Affinity and Narrow Specificity for Basic Ether Derivatives of Triphenylethylene. » *Journal of Biological Chemistry* 259 (7): 4223-29. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)43033-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)43033-X).

546. White, R.W., et W.D. Emmons. 1962. « The Chemistry of Permaleic Acid ». *Tetrahedron* 17 (1-2): 31-34. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)99002-7](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)99002-7).
547. Whittock, Neil V., Louise Izatt, Anuska Mann, Tessa Homfray, Christopher Bennett, Sahar Mansour, Jane Hurst, et al. 2003. « Novel Mutations in X-Linked Dominant Chondrodysplasia Punctata (CDPX2) ». *Journal of Investigative Dermatology* 121 (4): 939-42. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12489.x>.
548. Williams, Shawn, Randy K. Bledsoe, Jon L. Collins, Sharon Boggs, Millard H. Lambert, Ann B. Miller, John Moore, et al. 2003. « X-Ray Crystal Structure of the Liver X Receptor  $\beta$  Ligand Binding Domain ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (29): 27138-43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302260200>.
549. Willy, P J, K Umesono, E S Ong, R M Evans, R A Heyman, et D J Mangelsdorf. 1995. « LXR, a Nuclear Receptor That Defines a Distinct Retinoid Response Pathway. » *Genes & Development* 9 (9): 1033-45. <https://doi.org/10.1101/gad.9.9.1033>.
550. Woodward, R. B., Franz Sondheimer, et David Taub. 1951. « THE TOTAL SYNTHESIS OF CHOLESTEROL ». *Journal of the American Chemical Society* 73 (7): 3548-3548. <https://doi.org/10.1021/ja01151a556>.
551. Worth, Graham A., Paul M. King, et W.Graham Richards. 1990. « Histamine Tautomerism and Its Mode of Action ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1036 (2): 158-61. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(90\)90028-U](https://doi.org/10.1016/0304-4165(90)90028-U).
552. Wren, Georgina H., et William Davies. 2024. « Cardiac Arrhythmia in Individuals with Steroid Sulfatase Deficiency (X-Linked Ichthyosis): Candidate Anatomical and Biochemical Pathways ». *Essays in Biochemistry*, avril, EBC20230098. <https://doi.org/10.1042/EBC20230098>.
553. Wu, Qian, Tomonori Ishikawa, Rosa Sirianni, Hao Tang, Jeffrey G. McDonald, Ivan S. Yuhanna, Bonne Thompson, et al. 2013. « 27-Hydroxycholesterol Promotes Cell-Autonomous, ER-Positive Breast Cancer Growth ». *Cell Reports* 5 (3): 637-45. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.006>.
554. Xiang, Tian-xiang, et Bradley D. Anderson. 2002. « A Computer Simulation of Functional Group Contributions to Free Energy in Water and a DPPC Lipid Bilayer ». *Biophysical Journal* 82 (4): 2052-66. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75553-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75553-7).
555. Yang, Chendong, Jeffrey G. McDonald, Amit Patel, Yuan Zhang, Michihisa Umetani, Fang Xu, Emily J. Westover, et al. 2006. « Sterol Intermediates from Cholesterol Biosynthetic Pathway as Liver X Receptor Ligands ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (38): 27816-26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603781200>.
556. Yang, Chendong, Liqing Yu, Weiping Li, Fang Xu, Jonathan C. Cohen, et Helen H. Hobbs. 2004. « Disruption of Cholesterol Homeostasis by Plant Sterols ». *Journal of Clinical Investigation* 114 (6): 813-22. <https://doi.org/10.1172/JCI22186>.
557. Yantsevich, Aleksei V., Yaroslav V. Dichenko, Farrell MacKenzie, Dmitry V. Mukha, Alexander V. Baranovsky, Andrei A. Gilep, Sergey A. Usanov, et Natallia V. Strushkevich. 2014. « Human Steroid and Oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase CYP 7B1: Substrate Specificity, Azole Binding and Misfolding of Clinically Relevant Mutants ». *The FEBS Journal* 281 (6): 1700-1713. <https://doi.org/10.1111/febs.12733>.
558. Yasuda, Tomoyuki, Didier Grillot, Jeffery T. Billheimer, François Briand, Philippe Delerive, Stephane Huet, et Daniel J. Rader. 2010. « Tissue-Specific Liver X Receptor Activation Promotes Macrophage Reverse Cholesterol Transport In Vivo ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (4): 781-86. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.195693>.
559. Yen, Pauline H., Birgit Marsh, Elizabeth Allen, Siao Ping Tsai, Jay Ellison, Lynn Connolly, Katherine Neiswanger, et Larry J Shapiro. 1988. « The Human X-Linked Steroid Sulfatase Gene and a Y-Encoded Pseudogene: Evidence for an Inversion of the Y Chromosome during Primate Evolution ». *Cell* 55 (6): 1123-35. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90257-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90257-7).
560. Yi, Tangsheng, Xiaoming Wang, Lisa M. Kelly, Jinping An, Ying Xu, Andreas W. Sailer, Jan-Ake Gustafsson, David W. Russell, et Jason G. Cyster. 2012. « Oxysterol Gradient Generation by Lymphoid Stromal Cells Guides Activated B Cell Movement during Humoral Responses ». *Immunity* 37 (3): 535-48. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.015>.
561. Yu, Liqing, Jennifer York, Klaus Von Bergmann, Dieter Lutjohann, Jonathan C. Cohen, et Helen H. Hobbs. 2003. « Stimulation of Cholesterol Excretion by the Liver X Receptor Agonist Requires ATP-Binding Cassette



- Transporters G5 and G8 ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (18): 15565-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301311200>.
- 562.Yutuc, Eylan, Roberto Angelini, Mark Baumert, Natalia Mast, Irina Pikuleva, Jillian Newton, Malcolm R. Clench, et al. 2020. « Localization of Sterols and Oxysterols in Mouse Brain Reveals Distinct Spatial Cholesterol Metabolism ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (11): 5749-60. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917421117>.
- 563.Zagami, Paola, et Lisa Anne Carey. 2022. « Triple Negative Breast Cancer: Pitfalls and Progress ». *Npj Breast Cancer* 8 (1): 95. <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00468-0>.
- 564.Zampieri, Stefania, Synthia H. Mellon, Terry D. Butters, Marco Nevyjel, Douglas F. Covey, Bruno Bembi, et Andrea Dardis. 2009. « Oxidative Stress in NPC1 Deficient Cells: Protective Effect of Allopregnanolone ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13 (9b): 3786-96. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00493.x>.
- 565.Zelcer, N. 2006. « Liver X Receptors as Integrators of Metabolic and Inflammatory Signaling ». *Journal of Clinical Investigation* 116 (3): 607-14. <https://doi.org/10.1172/JCI27883>.
- 566.Zelcer, Noam, Cynthia Hong, Rima Boyadjian, et Peter Tontonoz. 2009. « LXR Regulates Cholesterol Uptake Through Idol-Dependent Ubiquitination of the LDL Receptor ». *Science* 325 (5936): 100-104. <https://doi.org/10.1126/science.1168974>.
- 567.Zerbinati, Chiara, et Luigi Iuliano. 2017. « Cholesterol and Related Sterols Autoxidation ». *Free Radical Biology and Medicine* 111 (octobre):151-55. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.013>.
- 568.Zerenturk, Eser J., Laura J. Sharpe, et Andrew J. Brown. 2012. « Sterols Regulate 3 $\beta$ -Hydroxysterol  $\Delta$ 24-Reductase (DHCR24) via Dual Sterol Regulatory Elements: Cooperative Induction of Key Enzymes in Lipid Synthesis by Sterol Regulatory Element Binding Proteins ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821 (10): 1350-60. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.07.006>.
- 569.Zhang, Hanrui. 2018. « Lysosomal Acid Lipase and Lipid Metabolism: New Mechanisms, New Questions, and New Therapies ». *Current Opinion in Lipidology* 29 (3): 218-23. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000507>.
- 570.Zhang, Yuan, Joyce J. Repa, Karine Gauthier, et David J. Mangelsdorf. 2001. « Regulation of Lipoprotein Lipase by the Oxysterol Receptors, LXR $\alpha$  and LXR $\beta$  ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (46): 43018-24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107823200>.
- 571.Zhu, Kunrui, Xinyi Yang, Hebei Tai, Xiaorong Zhong, Ting Luo, et Hong Zheng. 2024. « HER2-Targeted Therapies in Cancer: A Systematic Review ». *Biomarker Research* 12 (1): 16. <https://doi.org/10.1186/s40364-024-00565-1>.
- 572.Zhuang, Jingjing, Haikun Zhang, Rong Zhou, Lili Chen, Jing Chen, et Xu Shen. 2013. « Regulation of Prostaglandin F2 $\alpha$  against  $\beta$  Amyloid Clearance and Its Inflammation Induction through LXR/RXR Heterodimer Antagonism in Microglia ». *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 106 (octobre):45-52. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2013.09.002>.
- 573.Zielinski, Zosia A. M., et Derek A. Pratt. 2016. « Cholesterol Autoxidation Revisited: Debunking the Dogma Associated with the Most Vilified of Lipids ». *Journal of the American Chemical Society* 138 (22): 6932-35. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b03344>.
- 574.Zosia A M Zielinski, Derek A Pratt. 2019. « H-Atom Abstraction vs Addition: Accounting for the Diverse Product Distribution in the Autoxidation of Cholesterol and Its Esters ». *Journal of the American Chemical Society* 141 (7): 3037-51. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b11524>.
- 575.Zuercher, William J., Richard G. Buckholz, Nino Campobasso, Jon L. Collins, Cristin M. Galardi, Robert T. Gampe, Stephen M. Hyatt, et al. 2010. « Discovery of Tertiary Sulfonamides as Potent Liver X Receptor Antagonists ». *Journal of Medicinal Chemistry* 53 (8): 3412-16. <https://doi.org/10.1021/jm901797p>.



Received: 23 November 2021 | Revised: 7 March 2022 | Accepted: 21 March 2022

DOI: 10.1002/jev2.12211

## RESEARCH ARTICLE



## Targeting the liver X receptor with dendrogenin A differentiates tumour cells to secrete immunogenic exosome-enriched vesicles

Michel Record<sup>1</sup> | Mehdi Attia<sup>1</sup> | Kevin Carayon<sup>1</sup> | Laly Pucheu<sup>1</sup> | Julio Bunay<sup>1</sup> | Régis Soules<sup>1</sup> | Silia Ayadi<sup>1</sup> | Bruno Payré<sup>1</sup> | Laure Perrin-Cocon<sup>2</sup> | Florence Bourgaillh<sup>3</sup> | Antonin Lamazière<sup>4</sup> | Vincent Lotteau<sup>2</sup> | Marc Poirot<sup>1</sup> | Sandrine Silvente-Poirot<sup>1</sup> | Philippe de Medina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Team "Cholesterol Metabolism and Therapeutic Innovations" Cancer Research Centre of Toulouse (CRCT), UMR 1037 INSERM, UMR 5071 CNRS, Université de Toulouse III, Equipe labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer, French network for Nutrition And Cancer Research (NACRe network), France

<sup>2</sup>Team "Viral Infection, Metabolism and Immunity, CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Univ Lyon, Inserm, UMR113, Université Claude Bernard Lyon CNRS, UMR5304, INS de Lyon, Lyon, France

<sup>3</sup>Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie, Faculté de Médecine Rangueil, Toulouse, France

<sup>4</sup>Sorbonne Université/INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, AP-HP/STU, Hôpital Saint Antoine, Département de métabolisme clinique, Paris, France

## Correspondence

Michel Record, Marc Poirot, Sandrine Silvente-Poirot and Philippe de Medina, Team "Cholesterol Metabolism and Therapeutic Innovations" Cancer Research Centre of Toulouse (CRCT), UMR 1037 INSERM, UMR 5071 CNRS, Université de Toulouse III, Equipe labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer, French network for Nutrition And Cancer Research (NACRe network), France.  
Email: michel.record@inserm.fr;  
marc.poirot@inserm.fr;  
sandrine.poirot@inserm.fr;  
philippe.de-medina@inserm.fr

## Funding Information

Institut National Du Cancer, Grant/Award Number: PLBio 12-130; Institut National du Cancer (INCA), Grant/Award Number: PLBio 20-160; Fondation Toulouse Cancer Santé

## Abstract

Tumour cells are characterized by having lost their differentiation state. They constitutively secrete small extracellular vesicles (sEV) called exosomes when they come from late endosomes. Dendrogenin A (DDA) is an endogenous tumour suppressor cholesterol-derived metabolite. It is a new class of ligand of the nuclear Liver X receptors (LXR) which regulate cholesterol homeostasis and immunity. We hypothesized that DDA, which induces tumour cell differentiation, inhibition of tumour growth and immune cell infiltration into tumours, could functionally modify sEV secreted by tumour cells. Here, we have shown that DDA differentiates tumour cells by acting on the LXR $\beta$ . This results in an increased production of sEV (DDA-sEV) which includes exosomes. The DDA-sEV secreted from DDA-treated cells were characterized for their content and activity in comparison to sEV secreted from control cells (C-sEV). DDA-sEV were enriched, relatively to C-sEV, in several proteins and lipids such as differentiation antigens, "eat-me" signals, lipidated LC3 and the endosomal phospholipid bis(monoacylglycerol)phosphate, which stimulates dendritic cell maturation and a Th1 T lymphocyte polarization. Moreover, DDA-sEV inhibited the growth of tumours implanted into immunocompetent mice compared to control conditions. This study reveals a pharmacological control through a nuclear receptor of exosome-enriched tumour sEV secretion, composition and immune function. Targeting the LXR may be a novel way to reprogram tumour cells and sEV to stimulate immunity against cancer.

## KEYWORDS

bis(monoacylglycerol)phosphate, cancer, cholesterol, dendrogenin A, differentiation, exosomes, Lysophosphatidic acid, nuclear receptor

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/), which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2022 The Authors. *Journal of Extracellular Vesicles* published by Wiley Periodicals, LLC on behalf of the International Society for Extracellular Vesicles

*J Extracell Vesicles*. 2022;11:e12211.  
<https://doi.org/10.1002/jev2.12211>

[wileyonlinelibrary.com/journal/jev2](https://onlinelibrary.com/journal/jev2) | 1 of 21



## The Cholesterol-5,6-Epoxyde Hydrolase: A Metabolic Checkpoint in Several Diseases

8

Philippe de Medina, Silia Ayadi, Khadijetou Diallo, Julio Buñay, Laly Pucheu, Régis Soulès, Michel Record, Severine Brillouet, Lavinia Vija, Frédéric Courbon, Sandrine Silvente-Poirot, and Marc Poirot

### Abstract

Cholesterol-5,6-epoxides (5,6-ECs) are oxysterols (OS) that have been linked to several pathologies including cancers and neuro-degenerative diseases. 5,6-ECs can be produced from cholesterol by several mechanisms including reactive oxygen

species, lipoperoxidation, and cytochrome P450 enzymes. 5,6-ECs exist as two different diastereoisomers: 5,6 $\alpha$ -EC and 5,6 $\beta$ -EC with different metabolic fates. They can be produced as a mixture or as single products of epoxidation. The epoxide ring of 5,6 $\alpha$ -EC and 5,6 $\beta$ -EC is very stable and 5,6-ECs are prone to hydration by the cholesterol-5,6-epoxide hydrolase (ChEH) to give cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol, which can be further oxidized into oncosterone. 5,6 $\alpha$ -EC is prone to chemical and enzymatic conjugation reactions leading to bioactive compounds such as dendrogenins, highlighting the existence of a new metabolic branch on the cholesterol pathway centered on 5,6 $\alpha$ -EC. We will summarize in this chapter current knowledge on this pathway which is controlled by the ChEH.

Philippe de Medina, Sandrine Silvente-Poirot and Marc Poirot contributed equally with all other contributors.

P. de Medina · S. Ayadi · K. Diallo · J. Buñay · L. Pucheu · R. Soulès · M. Record · S. Silvente-Poirot · M. Poirot (✉)  
Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Inserm, CNRS, University of Toulouse, Team INOV: "Cholesterol Metabolism and Therapeutic Innovations", Toulouse, France

Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Toulouse, France

French Network for Nutrition Physical Activity and Cancer Research (NACRe Network), Jouy-en-Josas, France  
e-mail: marc.poirot@inserm.fr

S. Brillouet  
Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Inserm, CNRS, University of Toulouse, Team INOV: "Cholesterol Metabolism and Therapeutic Innovations", Toulouse, France

Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Toulouse, France

French Network for Nutrition Physical Activity and Cancer Research (NACRe Network), Jouy-en-Josas, France

Department of Radiopharmacy, Institut Universitaire du Cancer Toulouse – Oncopole, Toulouse, France

L. Vija · F. Courbon  
Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Inserm, CNRS, University of Toulouse, Team INOV: "Cholesterol Metabolism and Therapeutic Innovations", Toulouse, France

Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer, Toulouse, France

French Network for Nutrition Physical Activity and Cancer Research (NACRe Network), Jouy-en-Josas, France

Department of Medical Imaging, Institut Universitaire du Cancer Toulouse – Oncopole, Toulouse, France

© The Author(s), under exclusive license to Springer Nature Switzerland AG 2024  
G. Lizard (ed.), *Implication of Oxysterols and Phytosterols in Aging and Human Diseases*, *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1440, [https://doi.org/10.1007/978-3-031-43883-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-031-43883-7_8)

149